ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON PROTEINASEN-INHIBITOREN AUS MEERSCHWEINCHENSAMENBLASEN

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE REAKTIVEN ZENTREN VON PROTEINASEN-INHIBITOREN

Edwin Fink
München
1970
1971

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON PROTEINASEN-INHIBITOREN AUS MEERSCHWEINCHENSAMENBLASEN

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE REAKTIVEN ZENTREN VON PROTEINASEN-INHIBITOREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Edwin Fink

München 1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. E. Werle

2. Berichterstatter: Prof. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 3.2.1971

Fotodruck: Mikrokopie GmbH, 8 München 22, Bruderstraße 9

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle danke ich herzlich für die großzügige Förderung meiner Arbeit.

Besonders danken möchte ich Herrn Priv. Doz. Dr. H. Fritz für zahlreiche Diskussionen und wertvolle Anregungen.

Inhaltsübersicht

		Seite
1	Einleitung und Zielsetzung	4
2	Einführende Übersicht der Proteinasen-Inhibitoren	5
2.1	Entdeckung der Proteinasen-Inhibitoren	5
2.2	Isolierungsmethoden	6
2.3	Wirkungsweise	7
2.3.1	Spezifität und allgemeine Wirkungsweise	7
2.3.2	Reaktives Zentrum	9
2.3.3	Reaktionsmechanismus	11
2.3.4	Temporäre Hemmung	11
2.4	Aminosäurezusammensetzung und Struktur der Inhibitoren	13
2.5	Physiologische Bedeutung	14
2.5.1	Allgemeiner Überblick	15
2.5.2	Inhibitoren aus Sperma und Samenblasen	16
3	Eigene Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion	20
3.1	Reindarstellung von Inhibitoren aus Meerschweinchensamenblasen	20
3.1.1	Gehalt der Samenblasen an Inhibitor	20
3.1.2	Isolierung mit wasserunlöslichem Trypsinharz	24
3.1.3	Isolierung der Inhibitoren ohne Trypsinharz	24
3.2	Charakterisierung der isolierten Inhibitoren	29
3.2.1	Hemmverhalten	29
3.2.2	Aminosäurezusammensetzung und Endgruppen	37

		Seite
3.3	Tryptische Peptide des Trypsin-Plasmin-Inhibitors	39
3.3.1	Nomenklatur	40
3.3.2	Trennung der Peptide und ihre Aminosäurezusammensetzung	40
3.3.3	Sequenzen der Peptide	46
3.4	Modifizierung von nativem MTI durch Trypsin	55
3.5	Untersuchungen am reaktiven Zentrum verschiedener Inhibitoren	58
3.5.1.1	Hemmzentrum von Trypsininhibitoren	59
3.5.1.2	Prinzip der Untersuchungen	59
3.5.1.3	Untersuchte Hemmstoffe	59
3.5.2	Beeinflussung des Hemmverhaltens gegenüber Trypsin	61
3.5.2.1	Lysin-Inhibitoren	62
3.5.2.2	Arginin-Inhibitoren	65
3.5.3	Beeinflussung des Hemmverhaltens polyvalenter Inhibitoren	69
3.5.4	Beeinflussung des Hemmverhaltens modifizierter Inhibitoren	73
4	Material und Methoden	76
4.1	Material	76
4.2	Methoden	78
4.2.1	Bestimmung von Proteasen und Inhibitoren	78
4.2.2	Gewinnung des Rohextraktes	79
4.2.3	Isolierung der Inhibitoren aus dem Rohextrakt mittels wasserunlöslichem Trypsinharz	81
4.2.4	Ionenaustauschchromatographie über Sulfoäthyl-Sephadex	82
4.2.5	Ausschlußchromatographie	82
4.2.6	Charakterisierung der Inhibitoren	83

		Seite
4.2.6.1	Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung	83
4.2.6.2	Molekulargewichtsbestimmung	83
4.2.7	Isolierung und Sequenzierung der tryptischen Peptide von T-MTPI	84
4.2.7.1	Reduktion und Carboxymethylierung	84
4.2.7.2	Tryptische Spaltung	84
4.2.7.3	Isolierung der Peptide	85
4.2.7.4	Endgruppenbestimmung und Sequenzierung	86
4.2.7.5	Aminosäureanalyse	87
4.2.8	Modifizierung der Lysin- und Argininreste von Inhibitoren	87
4.2.8.1	Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid	87
4.2.8.2	Freisetzung der Inhibitoren aus ihren Polymaleoylderivaten	88
4.2.8.3	Umsetzung mit Butandion-(2,3)-Reagens	88
4.2.9	Versuche mit Exopeptidasen	89
4.2.9.1	Aminopeptidase M	89
4.2.9.2	Carboxypeptidase A	89
4.2.9.3	Carboxypeptidase B	90
5	Zusammenfassung	91
6	Literaturverzeichnis	95
	Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen	101
	Lebenslauf	102

1. Einleitung

In den letzten drei Jahrzenten wurden in tierischen und pflanzlichen Geweben und Sekreten Proteinasen-Inhibitoren von Proteincharakter in großer Vielfalt entdeckt.

Das Auftreten dieser speziellen Eiweißstoffe in allen untersuchten Organismen weist auf ihre allgemeine Bedeutung hin. Zahlreiche Arbeitsgruppen begannen daher mit der Erforschung dieses Gebietes.

Ein Ziel war und ist es, die physiologische Bedeutung der Proteinasen-Inhibitoren aufzuklären. Verbunden mit der Reindarstellung von Inhibitoren unterschiedlichster Herkunft richteten verschiedene Arbeitsgruppen ihre Anstrengungen auf die eingehende chemische Charakterisierung und die Erforschung der Reaktion der Hemmstoffe mit den proteolytischen Enzymen.

Im Rahmen der im Arbeitskreis von Werle durchgeführten Untersuchungen war mit die Aufgabe gestellt, bei einer Reihe von Inhibitoren das reaktive Zentrum, das mit dem aktiven Zentrum der Proteinase reagiert, zu identifizieren und speziell die in Samenblasen des Meerschweinchens vorkommenden Proteinasen-Inhibitoren zu isolieren und eingehend zu charakterisieren.

2. Einführende Übersicht der Proteinasen-Inhibitoren

2.1 Entdeckung der Proteinasen-Inhibitoren

Die Existenz von Trypsininhibitoren mit Proteincharakter war schon um die Jahrhundertwende bekannt. Die intensive chemische Erforschung begann jedoch erst mit den Arbeiten von Kunitz.

1936 isolierten Kunitz und Northrop (71) einen Trypsininhibitor aus Rinderpankreas. Spätere Untersuchungen (1,2,3,31) wiesen dessen Identität mit dem 1930 von Kraut, Frey und Werle (66) in Organen des Rindes entdeckten Kallikrein-Inhibitor nach.

Am Inhibitor aus Sojabohnen führte Kunitz ausgedehnte Studien durch (67 - 70). Er isolierte den 1 : 1 Komplex mit Trypsin, arbeitete quantitative Nachweismethoden aus und entdeckte die Reversibilität der Komplexbildung (Dissoziation im sauren Medium, Reassoziation bei Erhöhung des pH-Wertes). Daraufhin stellte er das Konzept des Gleichgewichts zwischen Inhibitor und Enzym und Komplex auf und führte erste Messungen der Gleichgewichtskonstanten dieser Reaktion durch. Er fand grosse Unterschiede der Geschwindigkeit von Assoziation und Dissoziation in verschiedenen Enzym-Inhibitor-Systemen und erkannte, daß der native Zustand wesentlich ist für die Aktivität des Inhibitors.

Der erste pflanzliche Inhibitor war 1944 (45,7) aus Sojabohnen gewonnen worden. Außer in Leguminosen wurden z. B. auch in Kartoffeln, Erdnüssen und Getreide Proteinasen-Inhibitoren höheren Molekulargewichts entdeckt und teilweise näher charakterisiert (Übersicht s. 94).

Kazal isolierte 1948 (64) aus Rinderpankreas einen spezifisch gegen Trypsin wirksamen Hemmstoff. Weitere spezifische Trypsininhibitoren gewannen Fritz, Trautschold und Werle aus dem Pankreassekret bzw. Pankreasgewebe verschiedener Säugetiere und des Menschen (10,30). Gleichzeitig isolierten Greene u. Mitarb. aus den Pankreassekreten von Rind und Schwein spezifische Trypsininhibitoren (37,38,40).

2.2 Isolierungsmethoden

Im allgemeinen wurden bislang die klassischen Methoden der Proteinchemie wie fraktionierte Fällung, Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie und elektrophoretische Verfahren angewandt.

Einfachere und spezifischere Methoden machen sich die Komplexbildung mit den Proteinasen, die charakteristische Eigenschaft der Inhibitoren zunutze.

Kunitz (71) versetzte die niedermolekulare inhibitorhaltige Fraktion mit Trypsin, reinigte den gebildeten Trypsin-Inhibitor-Komplex durch wiederholtes Aussalzen und fällte das Tryp-

sin mit Trichloressigsäure aus.
Kassell u. Mitarb. (59,60) reinigten den nach der Methode von Kunitz gewonnenen Komplex an Dowex 1-X2; die durch Dialyse gegen verdünnte Salzsäure freigesetzten Komponenten trennten sie dann durch Fraktionierung über Sephadex G 50. Bei hoher Assoziationskonstante von Enzym und Inhibitor kann der Komplex ohne Schwierigkeiten durch Ausschlußchromatographie gereinigt werden.

Gleiche Spezifität, verbunden mit technischer Vereinfachung und größerer Wirtschaftlichkeit brachte das von Fritz u. Mitarb. in ausgedehntem Maßstab angewandte Isolierungsverfahren mittels wasserunlöslichem Trypsinharz (22,26,27).

2.3 Wirkungsweise der Proteinasen-Inhibitoren

2.3.1 Spezifität und allgemeine Wirkungsweise

Neben streng spezifisch gegen nur ein Enzym wirksamen Inhibitoren findet man polyvalente, die zwei oder auch mehrere Proteinasen zu hemmen vermögen (siehe Tabelle 1).
Die Proteinasen-Inhibitoren blockieren die proteolytische Fähigkeit der eiweißspaltenden Enzyme durch spezifische Bindung ihres reaktiven Zentrums an den Bereich des aktiven Zentrums des Enzyms unter Ausbildung eines stabilen Komplexes.
Die Assoziationskonstanten K_{ass} liegen bei einem pH-Wert um 8 extrem hoch, und zwar bei 10^7 bis über 10^{12} M^{-1} (75,83,34).

Tabelle 1: Hemmspektren verschiedener Proteinasen-Inhibitoren

	Trypsin	α-Chymotrypsin	Kallikrein	Plasmin
Ovomucoid (Huhn)	+	-	+	-
Rind:				
Pankreas (Kunitz)	+	+	+	+
Pankreas (Kazal)	+	-	-	-
Colostrum	+	-	-	+
Säugetiere:				
Pankreas	+	-	-	-
Caniden, Feliden:				
Gl.Submandibularis	+	+	-	-
Samenblasen:				
Meerschweinchen I	+	-	-	-
II	+	-	-	+
Maus	+	-	-	+
Rind I	+	-	-	+
II	+	+	+	+
Ascaris I	+	-	-	-
II	-	+	-	-
Bdelline	+	(+)	-	+
Sojabohnen (Kunitz)	+	+	+	+
(Bowman-Birk)	+	+	?	?
Kartoffel I	++	-	?	-
II	+	++	+	+
Mais	+	(+)	-	+
Erdnuß	+	+	+	+

2.3.2 Reaktives Zentrum

Die bisherigen experimentellen Befunde lassen den Schluß zu, daß es zwei Klassen von Trypsininhibitoren, nämlich sog.Lysin- und Arginin-Inhibitoren gibt. Bei ersteren wird durch chemische Modifizierung der Lysinreste, bei letzteren durch Modifizierung der Argininreste die Hemmaktivität beeinträchtigt bzw. aufgehoben (48). Vermutlich ist ein spezieller Lysin- bzw. Argininrest unmittelbar verantwortlich für die Spezifität und die Bindung an das Trypsinmolekül.

Polyvalente Inhibitoren können verschiedene reaktive Zentren für die einzelnen Proteinasen besitzen. So konnten Haynes u.Mitarb. am Beispiel bivalenter Inhibitoren aus Eiklar zeigen, daß diese Ovomucoide nach Modifizierung der Aminogruppe zwar gegenüber Trypsin inaktiv sind, -Chymotrypsin jedoch immer noch hemmen (50).

Die Bedeutung eines Argininrestes für die Hemmwirkung zeigten Laskowski u. Mitarb. an den Inhibitoren aus Sojabohnen und Eiklar (17,18,82). Durch Inkubation der beiden Inhibitoren mit 1 - 2 Molprozent Trypsin wird jeweils nur eine Peptidbindung gespalten, beim Inhibitor aus Sojabohnen eine Arg-Ile-Bindung, beim Ovomucoid eine Arg-Ala-Bindung. Die Geschwindigkeit der Komplexbildung mit Trypsin ist bei diesen "modifizierten" Inhibitoren (gespaltene Arg-X-Bindung) herabgesetzt. Spaltet man durch Inkubation mit Carboxypeptidase B den Argininrest ab, so

geht die Hemmaktivität völlig verloren (17,18,82).

Zu analogen Ergebnissen kamen Greene u. Mitarb. bei ihren Untersuchungen am spezifischen Trypsininhibitor aus Pankreassekret des Rindes (84).

Laskowski jr. (18) gelang auch die Resynthese der gespaltenen Peptidbindung. Es war festgestellt worden, daß bei der Dissoziation des Trypsin-Sojabohnentrypsininhibitor-Komplexes die Dissoziationsgeschwindigkeit zum nativen Inhibitor wesentlich höher ist als die zum modifizierten. Bei kinetisch kontrolliertem Reaktionsablauf muß daher bevorzugt die native Form gebildet werden. Die Autoren inkubierten modifizierten Inhibitor (gespaltene Arg-X-Bindung) mit äquimolarer Menge Trypsin. Durch rasche Änderung des pH-Wertes auf 2 oder Einbringen in neutrale 6 M Guanidinhydrochloridlösung wurde der Komplex gespalten. Der freigesetzte Inhibitor war zu über 95% nativ (intakte Arg-Ile-Bindung), ein klarer Beweis für die Resynthese der Peptidbindung.

Durch Einwirkung katalytischer Mengen Trypsin (4 - 5 Mol%) sowohl auf den modifizierten wie auf den nativen Inhibitor bei pH 4 wurde ein Gleichgewichtszustand erreicht, in dem 86% in modifizierter und 14% in nativer Form vorlagen (80).

2.3.3 Reaktionsmechanismus

Aus den bisher vorliegenden Ergebnissen schließt Laskowski auf folgenden Reaktionsverlauf: (75,77,53)

$$T + I \rightleftarrows L \rightleftarrows C \rightleftarrows L' \rightleftarrows T + I'$$

T Trypsin
I nicht modifizierter Inhibitor
L lockerer Komplex von Trypsin mit nicht modifiziertem Inhibitor
C stabiler Komplex
L' lockerer Komplex mit modifiziertem Inhibitor
I' modifizierter Inhibitor

Über eventuelle andere Zwischenstufen und Verzweigungen der Reaktion müssen weitere Untersuchungen Aufschluß geben. Formal ist die Reaktion identisch mit dem einfachst möglichen Verlauf der Hydrolyse einer Bindung durch irgendein Enzym unter Bildung einer kovalenten Zwischenstufe. Der Unterschied zwischen Inhibitoren und anderen Substraten liegt in der extrem hohen Stabilität von C (s.o.) bei den Inhibitoren.

2.3.4 Temporäre Hemmung

Die Komplexe von Trypsin mit den meisten Inhibitoren zerfallen nach längerer Inkubation in freies Trypsin und tryptische Spaltprodukte des Inhibitors. Dieses Phänomen der "Hemmung auf Zeit" wurde von Laskowski Sr. und Wu (72) als t e m p o r ä r e H e m m u n g und die Inhibitoren, die diese Erscheinung zeigen

als t e m p o r ä r e I n h i b i t o r e n bezeichnet. Von den Inhibitoren aus tierischen Organen mit Molekulargewichten unter 12 000 sind alle außer dem polyvalenten Kunitz-Inhibitor aus Rinderorganen temporär (72,24,9,93,40).

Der tryptische Abbau des Inhibitors wäre erklärbar durch Angreifen eines freien Trypsinmoleküls am Trypsin-Inhibitor-Komplex oder durch direkte Spaltung durch das im Komplex gebundene Trypsin.

Die Geschwindigkeit der Abnahme der Inhibitoraktivität ist abhängig vom molaren Verhältnis Trypsin : Inhibitor. Zusatz von freiem Trypsin zum inaktiven Komplex erhöht die Abbaugeschwindigkeit, Inhibitorüberschuß - wenn also kein freies Trypsin nachweisbar ist - verlangsamt sie. Daraus schlossen Laskowski Sr. und Wu (72) auf den Angriff eines weiteren Trypsinmoleküls auf den Komplex:

$$T + I \rightleftharpoons TI$$

$$TI + T \rightleftharpoons TIT \rightleftharpoons 2T + \text{Produkte}$$

Für den Reaktionsverlauf

$$T + I \rightleftharpoons TI$$

$$TI \rightleftharpoons T + \text{Produkte}$$

T = Trypsin
I = Inhibitor
TI = Trypsin-Inhibitor-Komplex

spricht die Beobachtung von Tschesche und Klein (93), daß die Inhibierung von Trypsin durch Schweinepankreasinhibitor (Kazal) nicht nur in Lösung sondern auch an wasserunlöslichem Trypsinharz temporär ist. Sterische Gründe schließen in letzterem Fall einen Angriff durch ein zweites Trypsinmolekül aus. Der Abbau muß vom Komplex aus verlaufen.

Wahrscheinlich kommen beide Reaktionsweisen vor. Bei Inhibitorüberschuß erfolgt der Abbau des Hemmstoffes aus dem Komplex heraus, ist jedoch Trypsin im Überschuß, so wird der Inhibitor im Komplex zusätzlich durch freies Trypsin angegriffen und inaktiviert.

2.4 Aminosäurezusammensetzung und Struktur der Inhibitoren

Die Molekulargewichte der Inhibitoren liegen im allgemeinen zwischen 5 000 und 60 000, meistens jedoch unter 20 000. Mit Ausnahme einiger Seruminhibitoren enthalten alle Cystein in Form von Cystin, alle enthalten Prolin und häufig kein oder wenig Tryptophan, Histidin, Methionin und Cystein. Dem hohen Gehalt an Cystin und Prolin wird die Starrheit der Molekel und die ungewöhnliche Stabilität gegenüber denaturierenden Agentien zugeschrieben.

Ob zwischen Inhibitoren unterschiedlichster Herkunft strukturelle Verwandtschaften bestehen, wird die Aufklärung ihrer Aminosäuresequenzen ergeben.

Vom polyvalenten Inhibitor aus Rinderorganen (61 - 63,11,13, 3) und von den spezifischen Trypsininhibitoren aus Schweinepankreas (93a), Rinderpankreas (36), Schafspankreas (55) und aus Ascaris lumbricoides var suum (19) sind die Primärstrukturen bekannt. Die drei spezifischen Trypsininhibitoren aus Pankreas bilden eine homologe Klasse. Keine Homologie besteht zwischen dem polyvalenten Rinderpankreas-Inhibitor und dem Rinderpankreas-Trypsininhibitor. Der Inhibitor aus Ascaris zeigt in seiner Primärstruktur keine Ähnlichkeit mit bekannten Sequenzen anderer Inhibitoren. Da bisher nur wenige Primärstrukturen von Inhibitoren aufgeklärt sind, kann die Zahl der homologen Klassen noch nicht abgeschätzt werden.

2.5 Physiologische Bedeutung (15,94)

Die physiologische Funktion der Inhibitoren ist weitgehend ungeklärt. Allgemein dürfte es Aufgabe der Inhibitoren sein, die Aktivität von proteolytischen Enzymen zu kontrollieren, besonders in Geweben, in denen sowohl Inhibitoren als auch Enzyme nebeneinander vorkommen.

2.5.1 Allgemeiner Überblick

Die im Blut gefundenen Inhibitoren haben sicherlich eine Funktion bei der Steuerung der Blutgerinnung und Fibrinolyse. Beim α_1-Antitrypsin vermutet man u.a., daß es die Lungen gegen Destruktion bei Entzündungen schützt. Homozygote mit fast totalem α_1-Antitrypsinschwund erkranken gehäuft an chronischer Bronchitis, Emphysem und Bronchiektasen (51).

Pankreasinhibitoren sollen die Freisetzung von Trypsin im Pankreasgewebe und damit die Aktivierung der Zymogene weiterer Proteinasen verhindern. Proteolytische Aktivität im Drüsenbereich würde zur Zerstörung des Gewebes mit allen schwerwiegenden Konsequenzen führen (akute Pankreatitis) (94).

Ascaris lumbricoides, ein im Verdauungstrakt von Menschen und Schweinen lebender parasitischer Nematode, besitzt inhibitorische Aktivität gegenüber Trypsin, Pepsin und Chymotrypsin. Die Annahme einer Schutzfunktion für den Parasiten in einer lebensbedrohenden Umgebung ist naheliegend (15,94).

Es gibt Anhaltspunkte, daß die Inhibitoren im Colostrum die Proteolyse der in der Milch enthaltenen Antikörper im Verdauungstrakt des Neugeborenen verhindern (73,95). Bei den wenigen untersuchten Säugetierarten wird im Colostrum solcher Spezies, die die Neugeborenen durch Colostrum mit Antikörpern versorgen, ein

wesentlich höherer Gehalt an Inhibitoren gefunden als bei denen, die den Fötus vor der Geburt über die Placenta mit Antikörpern versorgen. Ein direkter Nachweis der Schutzfunktion der Colostruminhibitoren für die γ-Globuline steht jedoch aus.

Inhibitoren im Eiklar wird eine Schutzfunktion während der Bebrütung zugeschrieben. Eine andere Möglichkeit ist ein Schutz gegen Bakterien und Viren. Im Eiklar selbst existieren keinerlei proteolytische Enzyme (15,94).

Auch die physiologische Rolle der Pflanzeninhibitoren liegt noch weitgehend im Dunkel. Es wurden Hypothesen aufgestellt über ihre unmittelbare Beteiligung an der Stoffwechselregulation, Schutz vor Autolyse während des Ruhezustandes und Schutz vor eindringenden Mikroorganismen (94).

2.5.2 Inhibitoren aus Sperma und Samenblasen

Die hohe Inhibitoraktivität im Sperma und in den Samenblasen der untersuchten Säugetiere und des Menschen (42) läßt eine wesentliche physiologische Bedeutung vermuten. Aber auch in diesen Fällen sind sichere Aussagen noch nicht möglich. Eine Schutzfunktion für die Spermien während der Speicherung im Nebenhoden kann keinesfalls die alleinige Aufgabe sein, da die Hauptmenge an Inhibitor nicht in den Nebenhoden, sondern in den Samenblasen gefunden wird, die keine Spermien enthalten

Erst bei der Ejakulation werden Spermien und Inhibitoren vereinigt.

Möglicherweise spielen die Inhibitoren im Gerinnungssystem des Sperma eine wesentliche Rolle. Da über Art und Bedeutung dieses Gerinnungssystems noch völlige Unklarheit herrscht, können keine Aussagen über eine Beteiligung der Inhibitoren gemacht werden.

Untersuchungen der männlichen Geschlechtsdrüsen der Caniden und Feliden, die keine Vesiculardrüsen besitzen, stehen noch aus.

1968 prüften Stambaugh und Bukley (87,88) die Extrakte gewaschener epididymaler Spermien, die durch Ultraschallbehandlung zerstört waren, auf Hyaluronidase- und Proteinaseaktivität. Sie vermuteten, daß solche Enzyme fähig wären, die zona pellucida (eine dicke, transparente Mucoproteinmembran des Eies) aufzulösen. Tatsächlich fanden sie in den Extrakten hohe Hyaluronidase- und hohe proteolytische Aktivitäten. Die kombinierte Wirkung beider Enzyme bewirkte eine schnelle und vollständige Auflösung der zona pellucida. Durch Zusatz von Sojabohnen- oder Limabohnen-Trypsininhibitor konnte die Zerstörung der Membran verhindert werden. Die Durchdringung der zona pellucida ist somit als enzymatischer Prozess charakterisiert, die eigentlich wirksame Komponente ist ein trypsinähnliches

Enzym. Die beiden Enzyme wurden als Komplex isoliert mit einem Molekulargewicht von 59 000. Lokalisiert ist die Enzymaktivität im Akrosom. H. Haendle u. Mitarb. (43) zeigten in Untersuchungen an Kaninchencheiern, daß Trypsininhibitor aus Humansperma und Meerschweinchensamenblasen die Auflösung der zona pellucida durch angereicherte akrosomale Protease vollständig inhibiert.

Die naheliegende Vermutung, daß es sich bei dem Inhibitor um den Dekapazitationsfaktor handle, wurde inzwischen von Zaneveld, Srivasta und Williams (98) widerlegt.

Kapazitation (5) ist ein physiologischer Vorgang während dem die Spermien die Fähigkeit erlangen, Eizellen zu befruchten. Die Kapazitation geht im Uterus und Eileiter vor sich (79). Im Samenplasma wurde ein Faktor entdeckt, der kapazitierte Spermien wieder dekapazitieren kann, d.h. die Spermien verlieren wieder die Fähigkeit zur Befruchtung (6,96). Die oben genannten Autoren konnten den Dekapazitationsfaktor (DF) isolieren, er zeigt keinerlei Hemmaktivität gegenüber Trypsin. Der DF verhindert die Durchdringung der zona radiata, das ist eine Ansammlung von Zellen, die die zona pellucida umgibt. Der Trypsininhibitor kann die Durchdringung der zona radiata durch das Spermium nicht verhindern (98). Die Wir-

kungsweise des DF ist ungeklärt, sein Molekulargewicht liegt um 500. Wahrscheinlich handelt es sich nicht um ein Polypeptid, evt. um ein Polysaccharid.

Aus dem bisher Bekannten darf man schließen, daß der Inhibitor an der Dekapazitation mitbeteiligt ist. Seine physiologische Aufgabe könnte in einer Schutzfunktion für die Schleimhäute des weiblichen Genitaltraktes und der Spermien voreinander bestehen.

3. Eigene Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

3.1 Reindarstellung von Inhibitoren aus Meerschweinchensamenblasen

3.1.1 Gehalt der Samenblasen an Inhibitor

H. Haendle u. Mitarb. (42) geben einen Gehalt an Inhibitor von 3 500 - 5 000 mIU/g Samenblasen für Trypsin' an; dieser Befund wurde von uns in etwa bestätigt (2 000 - 5 000 mIU/g). Genaue Bestimmungen des Inhibitorgehaltes in Rohextrakten sind nicht möglich, da die Extrakte stark getrübt sind und deshalb den Hemmtest verfälschen. Werden höhermolekulare Eiweißstoffe des wässrigen Rohextraktes aus Meerschweinchensamenblasen durch Zufügen von Perchlorsäure (Endkonzentration 3%) ausgefällt, so gehen etwa 40% des Inhibitors verloren. Ersetzt man die Eiweißfällung mit Perchlorsäure durch Gelfiltration über Sephadex G-50 medium, so wird der Verlust auf etwa 20% reduziert.

3.1.2 Isolierung mit wasserunlöslichem Trypsinharz

Mit der von uns (22) ausgearbeiteten Methode der selektiven Bindung von Inhibitor an Trypsinharz wurde in einem Schritt

' 1 mIU entspricht der Hemmung der Aktivität von 0,035 nMol titrierbarem Trypsin (s. Methodik)

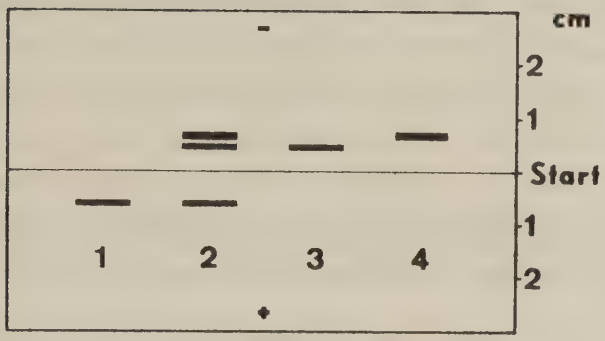

Abb.1 Elektrophorese von Inhibitorfraktionen, die über Trypsinharz isoliert wurden

Bedingungen

Puffer: Di-Natrium-tetra-Borat 0,05 M, pH 8,0
Spannung: 200 V
Zeit: 75 min
Träger: Celluloseacetat-Folie
Gerät: Elphor (Bender und Hobein)

1: T-MTI-a
2: Inhibitorgemisch, das nach Ablösung vom Trypsinharz über Biogel P2 entsalzt wurde.
3: T-MTPI-d
4: T-MTPI-f

Bezeichnung der Fraktionen: siehe Abb.2

vom säurebehandelten Rohhomogenat ausgehend ein etwa 60% reines Produkt gewonnen. Die Ausbeuten schwankten im Fall des Meerschweinchensamenblasen-Inhibitors zwischen 60 und 90%.

Bei der Überprüfung der Einheitlichkeit durch Elektrophorese auf Celluloseacetat-Folie wurden 3 mit Amidoschwarz anfärbbare Zonen festgestellt. 2 der Zonen liegen nahe beieinander (Abb.1). Bei einem weiteren Versuch wurden die Zonen aus der Folie getrennt eluiert. Alle 3 Fraktionen besitzen Hemmwirkung gegenüber Trypsin. Die früher angenommene Einheitlichkeit des Inhibitors (27,42) besteht also nicht.

Chromatographie an Sulfoäthyl-Sephadex

Zur präparativen Trennung der elektrophoretisch festgestellten Fraktionen erwies sich die Ionenaustauschchromatographie an Sulfoäthyl-Sephadex C-25 mit einem Ammoniumacetat-Konzentrationsgradienten bei pH 5,4 als geeignet. Mit dem Anfangspuffer (0,05 M) wurde zunächst eine trübe, inhibitorisch aktive Fraktion eluiert. Sie enthielt etwa 10% der Gesamtmenge an Inhibitor und bestand wahrscheinlich im wesentlichen aus Fremdeiweiß mit adsorbiertem Inhibitor. Diese Fraktion wurde bisher nicht weiter charakterisiert.

Im Gradienten von 0,05 - 0,15 M traten inhibitorisch aktive Bereiche auf, die zusammen 25% der Ausgangsmenge entsprachen. Die zweite Hauptfraktion (65% der Ausgangsmenge) wurde bei Konzentrationen von 0,2 - 0,4 M eluiert. Aus dem Elutionsdiagramm war ersichtlich, daß keine der beiden Fraktionen

einheitlich war. Nach Entsalzung und Gefriertrocknung wurde die erste Fraktion beim Rechromatographieren in 2 Hauptkomponenten getrennt, die zweite in 6.

Abb.2a und 2b: Chromatographie des spezifischen Trypsininhibitors (Abb.2a) und des Trypsin-Plasmin-Inhibitors (Abb. 2b) aus Meerschweinchensamenblasen an Sulfoäthyl-Sephadex.

Die hier eingesetzten Inhibitoren wurden durch Bindung an wasserunlösliches Trypsinharz aus mit Perchlorsäure behandeltem Gewebsextrakt isoliert. Ionenaustauschchromatographie an Sulfoäthyl-Sephadex führte zur Auftrennung in zwei Fraktionen. Die erste hemmt nur Trypsin, die zweite auch noch Plasmin (T-MTI und T-MTPI, das Präfix T weist hin auf den Isolierungsschritt mit Trypsinharz).

linke Ordinate: Inhibitorkonzentration im Eluat, angegeben in IU/ml;

rechte Ordinate: Molarität des Elutionspuffers;

Abszisse: Numerierung der Fraktionen.

Die Fraktionen von T-MTI und T-MTPI wurden in der Reihenfolge ihrer Elution mit kleinen Buchstaben bezeichnet (T-MTI-a, T-MTI-b, T-MTPI-a, u.s.w.)

Bedingungen:

Säulengröße: 1,8 x 120 cm
Säulenfüllung: Sulfoäthyl-Sephadex C-25
Elutionsmittel: Ammoniumacetatpuffer bzw. -Konzentrationsgradient von konstantem pH 5,4 (Molarität siehe rechte Ordinate;
Elutionsgeschwindigkeit: 10 cm/h;
Volumen der einzelnen Fraktionen: 10 ml

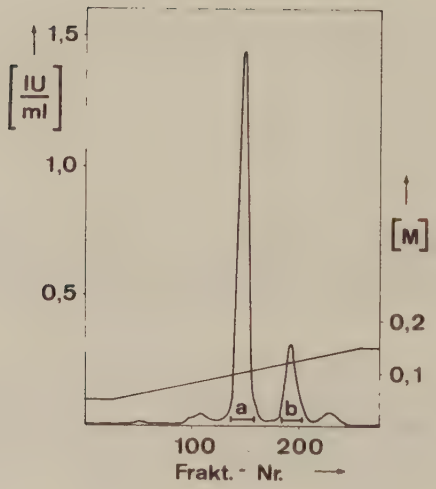

Abb. 2a: Rechromatographie des spezifischen Trypsininhibitors aus Meerschweinchensamenblasen (T-MTI)

Es wurden 383 IU aufgetragen, eluiert wurden 302, davon 216 IU als T-MTI-a, 54 IU als T-MTI-b und 32 IU in den Zwischenfraktionen.

3.1.3 Isolierung der Inhibitoren ohne Trypsinharz

Da wir vermuteten, daß die verschiedenen Komponenten der beiden Hauptfraktionen wenigstens zum Teil bei der Isolierung über Trypsinharz entstanden waren, vermieden wir bei einer späteren Aufarbeitung diesen Schritt. Auch die Behandlung des Rohhomogenats mit Perchlorsäure wurde unterlassen, die Abtrennung der hochmolekularen Proteine erfolgte in diesem Fall durch Gelfiltration über Sephadex G-50

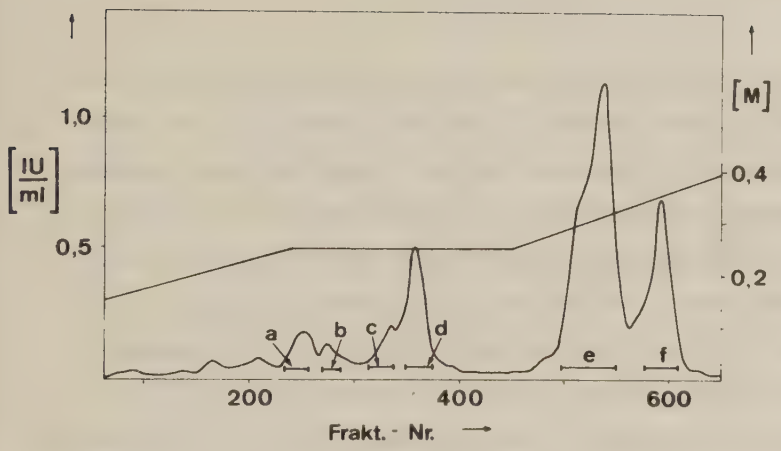

Abb. 2b: Rechromatographie der Trypsin-Plasmin-Inhibitor-fraktion aus Meerschweinchensamenblasen (T-MTPI) an Sulfoäthyl-Sephadex

Es wurden 845 IU aufgetragen und 822 eluiert.
T-MTPI-a: 35 IU; T-MTPI-b: 23 IU; T-MTPI-c: 47 IU;
T-MTPI-d:106 IU; T-MTPI-e:322 IU; T-MTPI-f:177 IU;
Zwischenfraktionen: 112 IU;

medium. Der nächste Reinigungsschritt bestand in Ionenaustauschchromatographie an SE-Sephadex, wobei gleichzeitig Auftrennung in die beiden Hauptfraktionen erfolgte. In der ersten Fraktion wurden 70 und in der zweiten 20% der Inhibitoraktivität gefunden. Die restlichen 10% waren im Vorlauf enthalten. Die Verhältnisse waren somit völlig verändert

gegenüber früheren Aufarbeitungen.

Eine Überprüfung ergab, daß bei der Eiweißfällung mit Perchlorsäure zwar die antitryptische, jedoch nicht die Antiplasminaktivität absinkt. Wie noch ausgeführt wird, enthalten Meerschweinchensamenblasen einen spezifischen Trypsin- und einen Trypsin-Plasmin-Inhibitor (MTI und MTPI). Bei der Säurebehandlung wird der Trypsininhibitor zum großen Teil ausgefällt. Dies läßt sich zeigen, wenn man die Hemmaktivitäten eines Extraktes gegenüber Trypsin und Plasmin vor und nach der Behandlung mit Perchlorsäure vergleicht. Der Verlust beim Isolierungsschritt mit Trypsinharz geht sicherlich ebenfalls vorwiegend zu Lasten des MTI. Nur so ist es zu erklären,

Abb. 3a und 3b: Chromatographie der Proteinasen-Inhibitoren aus Meerschweinchensamenblasen.

Die hier eingesetzten Inhibitorfraktionen wurden ohne Verwendung von Trypsinharz aus dem wäßrigen Gewebsextrakt (nicht mit Perchlorsäure behandelt) gewonnen.
Die Reinigung und Auftrennung in 2 Fraktionen (Trypsininhibitor und Trypsin-Plasmin-Inhibitor) erfolgte durch Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie an Sulfoäthyl-Sephadex. Das Präfix O bei O-MTI und O-MTPI weist hin auf die Isolierung ohne Trypsinharz.

(Weitere Erläuterungen zu den Abbildungen und die Elutionsbedingungen: siehe Legende zu Abb. 2a und 2b).

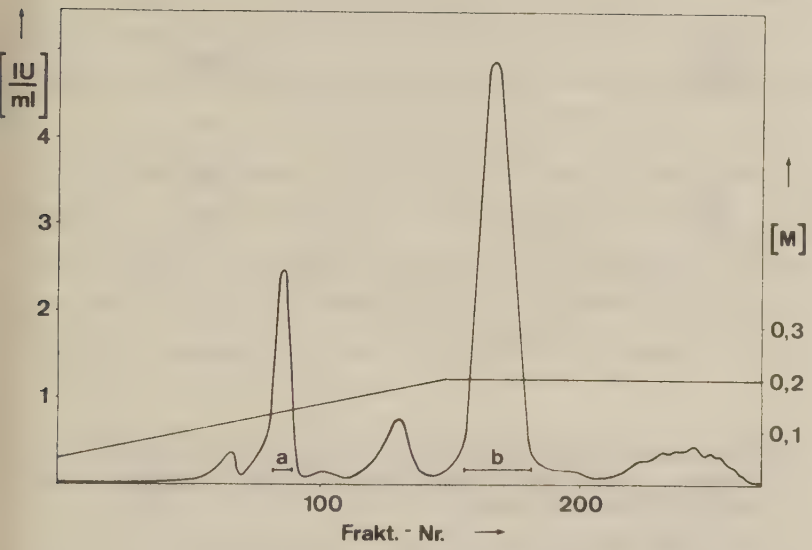

Abb. 3a: Rechromatographie der Trypsininhibitor-Fraktion aus Meerschweinchensamenblasen (O-MTI) an Sulfoäthyl-Sephadex.

Es wurden 1880 IU an O-MTI aufgetragen und 1666 eluiert.
O-MTI-a: 297 IU; O-MTI-b: 919 IU; Zwischenfraktionen: 450 IU;

daß nach Säurebehandlung und Isolierung über Trypsinharz MTPI überwiegt, während bei Vermeidung dieser Schritte MTI als Hauptkomponente gewonnen wird.

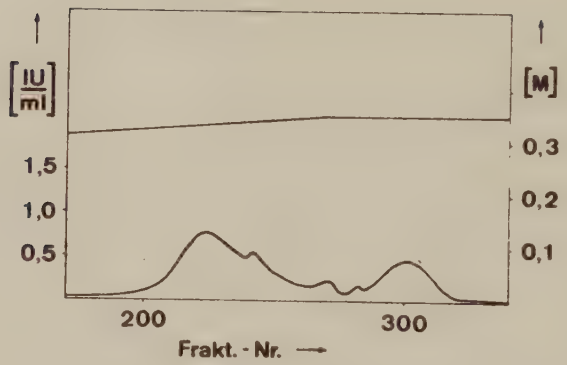

Abb. 3b: Rechromatographie der Trypsin-Plasmin-Inhibitorfraktion aus Meerschweinchensamenblasen (O-MTPI) an Sulfoäthyl-Sephadex.

Es wurden 500 IU aufgetragen und 482 eluiert. O-MTPI-a: 168 IU; O-MTPI-b: 97 IU;

Aus Fraktion I der ohne Säurebehandlung und ohne Trypsinharz isolierten Inhibitoren wurden bei nochmaliger Chromatographie an Sulfoäthyl-Sephadex zwei Hauptkomponenten, O-MTI-a und O-MTI-b (Abb. 3a) gewonnen. Diese beiden Fraktionen wurden unter gleichen Bedingungen rechromatographiert.

Eine eingehende Untersuchung der nach dem Elutionsdiagramm (Abb. 3b) 5 Komponenten der Fraktion II konnte wegen der Schwierigkeiten bei der Materialbeschaffung und des geringen

Anteils an MTPI nicht durchgeführt werden. Die Fraktionen O-MTPI-a und O-MTPI-b waren auch nach Rechromatographie nicht einheitlich (festgestellt durch Endgruppenbestimmung).

Die zahlreichen Komponenten von T-MTPI wurden wahrscheinlich zum Teil bei der Isolierung über Trypsinharz erzeugt, und zwar durch Spaltung einzelner Lys-X bzw. Arg-X-Bindungen, wobei die Bruchstücke durch die Disulfidbrücken verbunden bleiben und die Inhibitoraktivität nicht merklich beeinträchtigt wird.

Mit Sicherheit konnte festgestellt werden, daß die in Meerschweinchensamenblasen enthaltene Hemmaktivität gegenüber Trypsin nicht mit einem einheitlichen Protein verbunden ist, sondern daß mehrere eindeutig unterscheidbare Inhibitorkomponenten vorliegen. In den folgenden Untersuchungen wurden die Komponenten näher charakterisiert.

3.2 Charakterisierung der Proteinasen-Inhibitoren aus Meerschweinchensamenblasen

3.2.1 Hemmverhalten

Hemmspektren

Haendle (27) fand, daß der von ihm in Meerschweinchensamenblasen entdeckte Inhibitor auch gegenüber Plasmin aktiv ist, während die anderen untersuchten Proteasen (Chymotrypsin, Pep-

sin und Kallikrein) nicht gehemmt wurden.
Bei der Untersuchung des Hemmverhaltens der beiden Inhibitorfraktionen I und II wurde festgestellt, daß die Wirksamkeit gegenüber Plasmin ausschließlich der Fraktion II zuzuschreiben ist. Deshalb erhielten die Fraktionen I und II die Benennungen MTI und MTPI (siehe oben).

Bei den im folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, die Komponenten T-MTI-a und T-MTPI-e eingesetzt.

Keiner der beiden Inhibitoren beeinträchtigte die Spaltungsaktivität von Chymotrypsin gegenüber SUPHEPA oder Azo-Casein, auch nicht bei einem molaren Verhältnis von Inhibitor zu Enzym von 2,4 zu 1,0.
Kallikrein und Thrombin: 1,9 - 2,2 nMol der Inhibitoren hemmen die BAEE-spaltende Aktivität von 0,02 nMol Kallikrein aus Schweinepankreas nicht (Inkubationsvolumen 1,0 ml). Ebenso wirkungslos sind beide Inhibitoren gegenüber Thrombin: die Spaltungsaktivität von 2 NIH-Einheiten des Enzyms wird durch 0,2 nMol Inhibitor nicht beeinflußt.
Beide Inhibitoren hemmen die hydrolytische Aktivität von Trypsin (BAPNA oder Azo-Casein als Substrat). Die Wirksamkeit des Plasmins gegenüber den beiden Substraten wird nur durch die Komponenten der Fraktion II (MTPI) beeinträchtigt.

Tabelle 2

Hemmspektrum der Proteinasen-Inhibitoren aus Meerschweinchen-samenblasen

Enzym	MTI	MTPI
Trypsin	+	+
α-Chymotrypsin	-	-
Kallikrein		
Serum	-	-
Pankreas (Schwein)	-	-
Urin	-	-
Plasmin	-	+
Thrombin	-	-

Für beide Inhibitoren besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Hemmung der Trypsinaktivität und der Konzentration an Inhibitor (Abb.4). Bei MTI gilt die Linearität bis zu einer Hemmung von etwa 82% des vorgelegten Trypsins, bei MTPI bis etwa 85%.

Die Berechnung der Assoziationskonstanten K_{ass} des Trypsin-Inhibitor-Komplexes aus Abb. 4 nach der Methode von Green (35) ergibt für MTI etwa 5×10^8 M^{-1} und für MTPI etwa $3{,}5 \times 10^9$ M^{-1}.

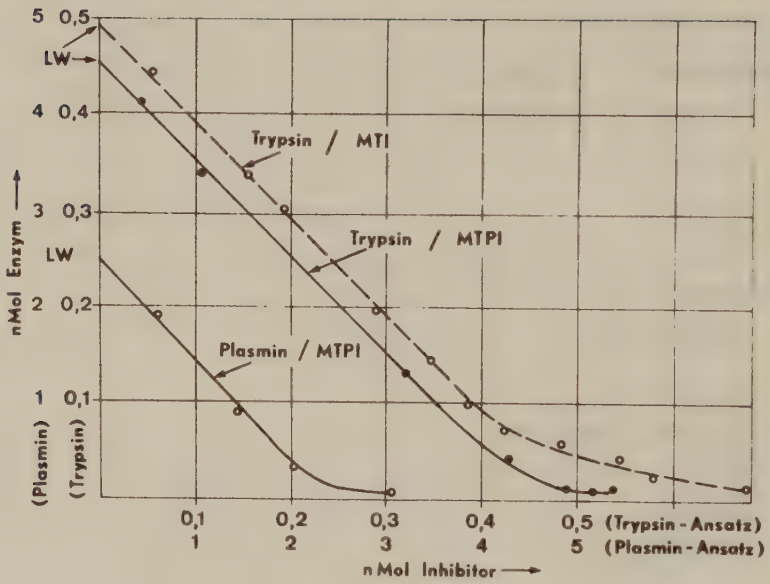

Abb.4: Abhängigkeit der Hemmung des Trypsin und Plasmin von der Inhibitorkonzentration (Hemmkurven)

Ordinate: Restaktivität der eingesetzten konstanten Menge (LW) an Trypsin bzw. Plasmin (in nMol) nach Zugabe unterschiedlicher Mengen an Inhibitor (s. Abszisse);

Abszisse: Zugegebene Menge an Inhibitor (nMol);

Ansatzvolumen: 3 ml

LW: Leerwert (bei jedem der Ansätze verwendete Menge an Enzym)

Eingesetzte Inhibitorkomponenten:
a) Trypsin-Hemmkurven

Substrat: BAPNA (23), die Versuchsbedingungen entsprechen denen in l.c. 28 und 26a;

Um vollständige Komplexbildung zu erreichen, wurden Trypsin und Inhibitor durchwegs 5 min in der Pufferlösung bei 25°C inkubiert. Erforderlich sind beim Trypsin-Plasmin-Inhibitor (MTPI) weniger als 20 sec, beim Trypsininhibitor (MTI) 1 min. Die Molarität der für die Testansätze verwendeten Trypsinlösung wurde nach Chase und Shaw (10b) mit p-Nitrophenyl-p'-guanidinobenzoat titriert. Zur Berechnung der Molarität der Inhibitorlösungen wurden die in Tab.3 angegebenen Molekulargewichte verwendet unter Berücksichtigung des Feuchtigkeits- und Salzgehaltes der eingewogenen Präparate.

b) Plasmin-Hemmkurve

Substrat: BAPNA (23), die Versuchsbedingungen entsprechen denen in l.c. 26a;

Inkubationszeit: 5 min

Die Molarität der verwendeten Plasminlösung wurde durch Hemmversuche mit einer Lösung bekannter Molarität an Kunitz-Inhibitor aus Rinderlunge bestimmt, Plasmin bildet mit diesem Inhibitor einen 1:1 Komplex. Die Molarität der Lösung des Kunitz-Inhibitors wurde mittels einer nach Chase und Shaw (10b) titrierten (s.o.) Trypsinlösung eingestellt (der Kunitz-Inhibitor bildet mit Trypsin ebenfalls einen 1:1 Komplex).

Wie Abb.4 weiter zeigt, verläuft die Hemmung von Plasmin durch T-MTPI-e bis zu 2/3 der vorgelegten Enzymmenge linear in Abhängigkeit von der Konzentration an Inhibitor. K_{ass} wurde aus der Abbildung zu 3 x 10^{8} M^{-1} berechnet.

Temporäre Hemmung

Beide Inhibitoren hemmen temporär. Bei der Inkubation von 32

nMol Trypsin mit 42 nMol T-MTI-a bzw. 36 nMol T-MTPI-e in 5 ml Puffer (TRA 0,2 M, pH 7,8) bei 37°C beträgt die Zeitspanne bis zur 50-prozentigen Inaktivierung (Verlust von 50% der Hemmwirkung) für T-MTI-a nur 48 min, für T-MTPI-e dagegen 23 h.

Zu Tab.3a: Aminosäurezusammensetzung von Komponenten des Trypsininhibitors

[a] Nach Oxydation mit Perameisensäure bestimmt, bezogen auf Asp

[b] Auch nach Oxydation mit Perameisensäure wurden, jeweils bezogen auf Asparaginsäure, für Cysteinsäure nur Werte zwischen 3 und 4 gefunden. In Analogie zu den Werten von T-MTI-a und T-MTI-b und unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes, bestimmt durch Gelfiltration, kommen nur die angegebenen Werte in Frage.

[c] Bei einigen Werten von O-MTI-a und O-MTI-b bestehen noch Unsicherheiten, die auch bei wiederholter Durchführung der Analysen mit unterschiedlichen Hydrolysezeiten nicht ausgeschlossen werden konnten.

[d] Spektrophotometrisch bestimmt (siehe 4.2.6.1)

[e] Die Werte ergeben sich wenn keine Amidierung vorliegt.

Zu Tab.3b: Aminosäurezusammensetzung von Komponenten des Trypsin-Plasmin-Inhibitors (unter Verwendung von Trypsinharz isoliert)

[a] Nach Oxydation mit Perameisensäure

[b] Spektrophotometrisch bestimmt (siehe 4.2.6.1)

[c] Die Werte ergeben sich wenn keine Amidierung vorliegt.

Tab.3a: Aminosäurezusammensetzung von Komponenten des Trypsininhibitors

	T-MTI-a			T-MTI-b			O-MTI-a			O-MTI-b		
Hydrolyse-zeit h	20	120		20	120		20	120		20	120	
Aminosäure			AS/mol			AS/mol			AS[c]/mol			AS[c]/mol
$CysSO_3H$	5,90[a]			5,75[a]			3,44[a]			3,96[a]		
$MetO_2$	0,00[a]			0,00[a]			0,35[a]			0,33[a]		
Asp	5,96	6,01	6	5,98	5,95	6	6,03	6,11	6	5,01	5,01	5
Thr	1,04	1,01	1	1,17	1,11	1	1,82	1,70	2	1,06	1,01	1
Ser	2,15	1,91	2	2,26	2,01	2	6,63	5,17	7	2,89	2,41	3
Glu	10,26	10,26	10	10,00	10,05	10	16,93	16,81	17	9,32	9,22	9
Pro	5,16	5,14	5	5,29	5,19	5	5,58	5,19	5-6	4,16	4,12	4
Gly	6,10	6,26	6	5,97	6,01	6	8,01	7,98	8	5,24	5,20	5
Ala	1,03	1,11	1	1,14	1,12	1	1,92	1,93	2	1,10	1,18	1
Cys	5,16	4,22	6	5,27	3,38	6	3,13	1,46	6[b]	3,64	3,32	6[b]
Val	1,82	2,96	3	1,76	2,56	3	5,47	6,97	7	2,31	3,18	3
Met	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0
Ile	2,57	3,87	4	2,31	4,02	4	2,36	3,57	3-4	1,95	3,01	3
Leu	5,11	5,14	5	4,87	5,08	5	4,67	4,58	4-5	4,01	3,90	4
Tyr	1,68	1,32	2	1,80	1,47	2	1,09	0,85	1	1,22	1,13	1
Phe	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0	0,96	0,92	1	0,26	0,28	0
Lys	0,91	1,03	1	1,14	1,17	1	4,88	5,06	5	2,11	2,20	2
His	1,61	1,25	2	1,75	1,70	2	5,10	5,12	5	2,57	2,58	2-3
Arg	5,96	5,94	6	6,00	6,00	6	9,19	9,01	9	5,88	6,16	6
Trp	0,2[d]		0	0,2[d]		0	0,2[d]		0	0,2[d]		0
Summe			60			60			88-91			55-56
Molekular-gewicht[e]			6498			6498			9931-10254			6275-6412

Tab.3b: Aminosäurezusammensetzung von Komponenten des Trypsin-Plasmin-Inhibitors (unter Verwendung von Trypsinharz isoliert)

	T-MTPI-d			T-MTPI-e			T-MTPI-f		
Hydrolysezeit [h]	20	120		20	120		20	120	
Aminosäure			AS / mol			AS / mol			AS / mol
$CysSO_3H$	5,92[a]			5,79[a]			5,92[a]		
$MetO_2$	0,93[a]			0,92[a]			0,96[a]		
Asp	6,00	6,05	6	6,01	6,00	6	6,00	5,99	6
Thr	3,91	3,74	4	3,75	3,67	4	3,84	3,58	4
Ser	5,00	4,26	5	5,73	4,79	6	5,14	3,91	5
Glu	4,11	4,28	4	4,11	4,14	4	4,07	4,19	4
Pro	2,11	2,10	2	3,01	3,14	3	2,27	2,36	2
Gly	5,14	5,27	5	4,96	5,01	5	4,89	4,92	5
Ala	0,16	0,16	0	1,41	1,45	1	0,01	0,02	0
Cys	5,17	4,96	6	5,20	5,29	6	4,85	3,03	6
Val	2,63	2,99	3	2,23	2,98	3	2,45	2,90	3
Met			1			1			1
Ile	0,96	1,36	1	0,98	1,09	1	0,85	1,03	1
Leu	3,13	3,15	3	3,07	3,03	3	3,03	2,96	3
Tyr	3,66	3,42	4	4,05	3,67	4	3,49	3,11	4
Phe	2,67	2,92	3	3,78	3,59	4	2,59	2,90	3
Lys	4,13	4,04	4	4,65	5,32	5	5,38	4,99	5
His	2,89	2,94	3	2,78	3,08	3	2,96	2,90	3
Arg	3,93	3,98	4	3,83	4,19	4	4,06	3,98	4
Trp	0,2[b]		0	0,2[b]		0	0,2[b]		0
Summe			58			63			59
Molekulargewicht[c]			6687			7217			6815

3.2.2 Aminosäurezusammensetzung und Endgruppen

Molekulargewichte

Die aus den Analysenwerten berechneten Molekulargewichte für die Inhibitoren (Tab.3a und 3b) stimmen gut mit den nach der Molekularsiebmethode (29) ermittelten Werten von 6 600 - 6 800 überein. Auffallend ist das hohe Molekulargewicht der Komponente O-MTI-a.

Endgruppen

Zur Bestimmung der N-terminalen Gruppen wurden die Inhibitorfraktionen nach der Methode von Gray (32) mit DNS-Chlorid (1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid) umgesetzt und die markierten Aminosäuren nach der Hydrolyse durch zweidimensionale Chromatographie auf Polyamidschichten identifiziert (78, 97). Der Versuch, die C-terminalen Gruppen mittels Carboxypeptidasen zu bestimmen war erfolglos.

Tab.4: N-terminale Gruppen der Inhibitorkomponenten aus Meerschweinchensamenblasen

Komponente	Endgruppe
O-MTI-a	Glx
O-MTI-b	Glx
T-MTI-a	Glx
T-MTI-b	Glx
T-MTI-d	Val
T-MTI-e	Phe (e_1)
	Ala (e_2)
T-MTI-f	Ser (f_1)
	Lys (f_2)

Meerschweinchensamenblasen-Trypsininhibitor

Bei allen Komponenten des spezifischen Trypsininhibitors, unabhängig von der Verwendung von Trypsinharz bei der Isolierung, wurde als Endgruppe Glx festgestellt. Da die Komponenten sich zum Teil wesentlich in ihrer Aminosäurezusammensetzung unterscheiden (O-MTI-a), beweist hier die Einheitlichkeit der Endgruppe nicht die Einheitlichkeit der Substanzen.
Bemerkenswert ist, daß die Zahl der Aminosäuren bei Komponente O-MTI-a das eineinhalb-fache der Komponente O-MTI-b beträgt. Diese Kettenverlängerung hat keinen Einfluß auf die Hemmwirkung.

Aufgrund des identischen Hemmverhaltens nehmen wir an, daß sich alle Komponenten von einem einheitlichen Grundkörper ableiten. Verlängert man diesen Grundkörper am C-Terminus oder am N-Terminus um Peptide unterschiedlicher Kettenlänge, so gelangt man zu den verschiedenen Komponenten. Mögliche Gründe für das Auftreten solcher "Iso-Inhibitoren" werden weiter unten diskutiert.
Die beiden Komponenten des MTI, die bei der Isolierungsmethode mittels Trypsinharz gewonnen wurden, haben identische Aminosäurezusammensetzungen.
Bei der Komponente T-MTI-a ist die Arg-X-Bindung des reaktiven Zentrums gespalten. Carboxypeptidase B setzt nämlich aus dieser Fraktion Arginin frei, wobei parallel dazu die Hemmaktivität zerstört wird (s.a. Tab.18). Komponente T-MTI-b wird durch Carb-

oxypeptidase B nicht inaktiviert (weitere Diskussion siehe unten).

Meerschweinchensamenblasen-Trypsin-Plasmin-Inhibitor
Die Bestimmung der N-Terminalen der Komponente von T-MTPI wies nur die Fraktion d als einheitliches Protein aus.

Die Heterogenität der Fraktionen a,b und c verbot es, sie für weitere Untersuchungen einzusetzen. Da sie insgesamt nur etwa 15% des T-MTPI enthielten, war auch eine weitere Reinigung nicht sinnvoll.

Bei den Fraktionen e und f wurden jeweils 2 N-terminale Aminosäuren bestimmt, sie bestehen also jeweils aus 2 Komponenten e_1,e_2 und f_1,f_2.

In den Aminosäurezusammensetzungen der 3 Fraktionen bestanden nur geringe Unterschiede (siehe Tab.3).
Die strukturelle Verwandtschaft der einzelnen Komponenten wird im Anschluß an die Sequenzermittlung der tryptischen Peptide von T-MTPI diskutiert.

3.3 Tryptische Peptide des Trypsin-Plasmin-Inhibitors

Da bei der ersten Aufarbeitung überwiegend der Trypsin-Plasmin-Inhibitor angefallen war, begannen wir an diesem Hemmstoff mit der Aufklärung der Primärstruktur. Aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung und der Identität im Hemmverhalten war zu erwarten, daß sich alle Komponenten von einem Grundkörper mit der Zusammensetzung der Komponente d ableiten. Daher konnte es riskiert werden, für die Gewinnung der tryptischen Peptide ein Gemisch der Komponenten d,e und f einzusetzen.

3.3.1 Nomenklatur

Die tryptischen Peptide werden mit T-x.y.z bezeichnet; x gibt an, in welchem Peak das Peptid bei der Ionenaustauschchromatographie auftrat, y die Lage als erste, zweite oder dritte anfärbbare Zone bei der Papierchromatographie, wobei 1 der Auftragstelle am nächsten liegt; z gibt analog die Lage der anfärbbaren Zone bei der Hochspannungselektrophorese an.

3.3.2 Trennung der Peptide und ihre Aminosäurezusammensetzung

Nach Reduktion, Carboxymethylierung (12) und tryptischer Spaltung wurden die Peptide zuerst über Dowex 1X2 (85) in neun Fraktionen aufgetrennt (Abb.5).

Bei der Prüfung durch Papierchromatographie (44) zeigte sich, daß T-5,T-7,T-8 und T-9 einheitlich waren. Die Fraktionen T-1 bis T-4 und T-6 wurden durch präparative Papierchromatographie noch weiter aufgetrennt.

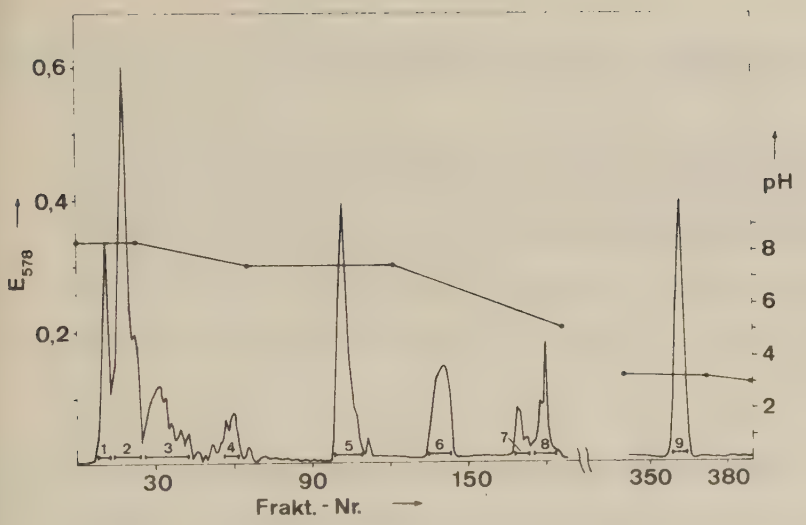

Abb.5: Fraktionierung der tryptischen Peptide von T-MTPI

Die Fraktionierung wurde nach l.c. 85 über Dowex 1-X2 durchgeführt. Aus den Fraktionen zu je 2,5 ml wurde jeweils 0,1 ml zur Prüfung auf den Peptidgehalt mit Ninhydrin nach alkalischer Hydrolyse (52) entnommen. Die Fraktionen wurden vereinigt wie im Diagramm angegeben.

Ordinate: Absorption bei 578 nm

Abszisse: Anzahl der Fraktionen

Aus T-1 wurden ein Peptid T-1.1 der Zusammensetzung Met, CM-Cys, Thr, Lys und freies Lysin, T-1.2 erhalten.

Bei T-2 konnte durch Papierchromatographie keine klare Trennung erzielt werden. 3 Fraktionen wurden gewonnen, die jedoch nicht

einheitlich waren, T-2.1,T-2.2 und T-2.3.

T-2.1 besteht zu gleichen Teilen aus den Peptiden T-2.11 Gly, Asx, Arg und T-2.12 Gly, Lys. Dies konnte ohne weitere Auftrennung bewiesen werden. Bei der Bestimmung der Endgruppen wurde nur Gly festgestellt. Nach einem Abbauschritt nach Edman wurden sowohl Asx wie Lys als DNS-markierte Aminosäuren gefunden.

T-2.2 war nach der Aminosäureanalyse sehr uneinheitlich und wurde daher durch Hochspannungselektrophorese weiter aufgetrennt in die Fraktionen T-2.2.1,T-2.2.2 und T-2.2.3. T-2.2.1 war für eine Auswertung zu uneinheitlich.
T-2.2.2 bestand zu etwa 70% aus T-2.11 und zu etwa 30% aus T-2.2.21 (Ala, Pro, Ser, Lys).
T-2.2.3 bestand zu 70% aus T-2.12, der Rest war T-2.31.
T-2.3 war ein Peptid Gly, Arg, T-2.31.
T-3 wurde durch Papierchromatographie in die Fraktionen T-3.1, T-3.2 und T-3.3 getrennt.
T-3.1 enthält neben etwa 70% eines Peptides Ser, Lys T-3.11 noch etwa 24% T-2.12 (Gly, Lys).
T-3.2: Phe, Ala, Pro, Ser, Lys;
T-3.3 war nicht einheitlich, es enthielt CM-Cys, Ile, Phe Ser und Lys.
Aus T-4 wurde durch Papierchromatographie ein reines Peptid

Tab.5: Aminosäureanalyse der nicht einheitlichen tryptischen Peptide des Trypsin-Plasmin-Inhibitors aus Meerschweinchemsamenblasen

In den Spalten 1,4,7 und 10 ist angegeben, in welchem molaren Verhältnis die Aminosäuren in den Hydrolysaten der 4 nicht einheitlichen Peptidfraktionen gefunden wurden. In den Spalten 2,3,5,6,8,9,11 und 12 sind die Werte den einzelnen in den Fraktionen enthaltenen Peptiden (jeweils 2 in einer Fraktion) zugeordnet.

	1	2	3	4	5	6
	T-2.1 (T-2.11+ T-2.12)	T-2.11	T-2.12	T-2.2.2 (T-2.11+ T-2.2.21)	T-2.11	T-2.2.21
Amino-Säure						
Asp	0,98	0,98		1,03	1,03	
Ser				0,25		0,25
Pro				0,23		0,23
Gly	2,05	1,00	1,05	0,91	0,91	
Ala				0,22		0,22
Lys	1,38		1,38	0,28		0,28
Arg	1,00	1,00		1,00	1,00	

	7	8	9	10	11	12
	T-2.2.3 (T-2.12+ T-2.31)	T-2.12	T-2.31	T-3.1 (T-3.11+ T-2.12)	T-2.12	T-3.11
Amino-Säure						
Asp				1,00		1,00
Ser						
Pro						
Gly	1,34	0,37	0,97	0,34	0,34	
Ala						
Lys	1,00		1,00	1,38	0,38	1,00
Arg	0,40	0,40				

Tab.6: Aminosäureanalyse der einheitlichen tryptischen Peptide des Trypsin-Plasmin-Inhibitors aus Meerschweinchensamenblasen

Aminosäure	T-1.1	T-1.2	T-3.2	T-4.1	T-5	T-6.1	T-6.2	T-7	T-8	T-9
CM-Cys	1,01				1,04				0,81	
Asp					3,11				1,98	
Thr	1,13								1,96	0,81
Ser			0,85	1,02	1,98	1,17	1,12			0,87
Glu						2,38	2,28	1,13	1,02	
Pro			0,78		1,14				0,92	
Gly				1,18					1,99	
Ala			0,86							
Val					1,04			0,99	0,91	
Met	0,38									
Leu						1,13	1,10	1,05	1,04	
Tyr				0,98				2,00	0,94	1,14
Phe			0,72							1,61
Lys	1,01	1	1,00			1,00	1,00			
His				0,96				1,12	0,96	1,00
Arg				1,00	2,00					

Tab.7: Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Peptide des Trypsin-Plasmin-Inhibitors aus Meerschweinchensamenblasen

Aminosäure	T-1.1	T-1.2	T-2.11	T-2.12	T-2.2.21	T-2.31	T-3.11	T-3.2	T-4.1	T-5	T-6.1	T-6.2	T-7	T-8	T-9
CM-Cys	1									1					1
Asp			1							3					2
Thr	1													1	2
Ser					1		1	1	1	2	1	1		1	
Glu											2	2	1		1
Pro					1			1		1					1
Gly			1	1		1			1						1
Ala					1			1							
Val										1			1		1
Met	1														
Leu											1	1	1		1
Tyr									1				2	1	1
Phe								1						2	
Lys	1	1		1	1		1	1			1	1			
His									1				1	1	1
Arg			1			1			1	2					

der Zusammensetzung Ser, His, Tyr, Gly, Arg, T-4.1 gewonnen. Eine zweite Fraktion, die bei der Papierchromatographie nicht gewandert war und mit Ninhydrin kaum, mit Amidoschwarz jedoch stark gefärbt wurde, bestand vermutlich aus einem oder mehreren großen Kettenabschnitten, die der tryptischen Spaltung widerstanden hatten.

T-5 war ein Peptid der Zusammensetzung CM-Cys, Pro, Val, Ser_2, Asx_3, Arg_2.

T-6 wurde durch Papierchromatographie in 2 Fraktionen identischer Aminosäurezusammensetzung Glx_2, Leu, Ser, Lys getrennt. Sie unterscheiden sich vermutlich durch den Amidierungsgrad der enthaltenen Glx. Es wurde versucht dies zu klären durch Vergleich der Analysenwerte von Hydrolysaten, die durch Säurespaltung bzw. durch enzymatischen Abbau gewonnen waren, jedoch wurden die Peptide durch Aminopeptidase M nicht angegriffen.

T-7: Glx, Val, Leu, Tyr_2, His

T-8: Thr, Ser, Tyr, Phe_2, His

T-9: CM-Cys, Asx_2, Thr_2, Glx, Pro, Gly_2, Val, Leu, Tyr, His

3.3.3 Sequenzen der Peptide

Die Sequenzen der Peptide wurden durch Edman-Abbau in Verbindung mit der Endgruppenbestimmung nach der Dansylmethode aufgeklärt und in einigen Fällen durch subtraktiven Edman-Abbau bestätigt (33,65).

Tab.8: Sequenzen der tryptischen Peptide des Trypsin-Plasmin-Inhibitors aus Meerschweinchensamenblasen (T-MTPI)

T-1.1	Met-Cys-Thr-Lys
T-1.2	Lys
T-2.11	Gly-Asx-Arg
T-2.12	Gly-Lys
T-2.2.21	Ala-Pro-Ser-Lys
T-2.31	Gly-Arg
T-3.11	Ser-Lys
T-3.2	Phe-Ala-Pro-Ser-Lys
T-4.1	Ser-His-Tyr-Gly-Arg
T-5	Val-Asx-Ser-Cys-Arg-Pro-Asx-Ser-Asx-Arg
T-6	Glx-Leu-Glx-Ser-Lys
T-7	Tyr-Val-Glx-His-Leu-Tyr
T-8	Phe-Thr-Phe-Ser-His-Tyr
T-9	Glx-Leu-Asx-Pro-Val-Gly-(Cys,Asx,Thr_2,Gly,His)-Tyr

Bei Peptid T-9 wurden 5 Aminosäuren abgespalten, das Restpeptid konnte nicht mehr weiter durch Edman-Abbau verkürzt werden. Als Carboxyl-ständige Aminosäure wurde mit Hilfe von Carboxypeptidase A Tyrosin festgestellt.

Vergleichen wir die Summe der einzelnen Aminosäuren aus den tryptischen Peptiden mit der Gesamtanalyse von T-MTPI-e, so ergeben sich zunächst erhebliche Differenzen. Zum Teil sind sie zu erklären durch Überlappung der Peptide, bedingt durch die Uneinheitlichkeit der eingesetzten Substanz und durch atypische tryptische Spaltung. Außerdem konnten ein oder mehrere Peptide nicht soweit gereinigt werden, daß eine klare Aussage über die Zusammensetzung und Sequenz möglich war.

Als Endgruppe der für die tryptische Spaltung eingesetzten Inhibitorfraktionen waren gefunden worden:

T-MTPI-d: Val
T-MTPI-e: Phe (T-MTPI-e_1) und Ala (T-MTPI-e_2)
T-MTPI-f: Ser (T-MTPI-f_1) und Lys (T-MTPI-f_2)

Die Aminosäurezusammensetzung aller Fraktionen stimmte weitgehend überein. Die Vermutung lag nahe, daß es sich um ein Gemisch verschiedener Komponenten ein und desselben Inhibitors handelte.

Unterschiede in den Aminosäureanalysen der 3 eingesetzten Fraktionen:

	T-MTPI-d	T-MTPI-e	T-MTPI-f
Ser	5	6	5
Pro	2	3	2
Ala	0	1(-1,5)	0
Phe	3	4	3
Lys	4	5	5

T-MTPI-d enthält gegenüber T-MTPI-f nur einen Lysinrest weniger. Bei T-MTPI-f sind die Analysenwerte der Aminosäuren Ser,Pro,Ala und Phe gegenüber denen von T-MTPI-e um eins verringert.

Da in den Aminosäurezusammensetzungen der verschiedenen Fraktionen trotz unterschiedlicher Endgruppen nur geringe Unterschiede bestanden, war es wahrscheinlich, daß sich die Komponenten nur im N-terminalen Molekülteil unterschieden. T-MTPI-d mit der Endgruppe Val war als Grundkörper zu betrachten. Fraktion T-MTPI-f enthält eindeutig einen Lysinrest mehr als T-MTPI-d, müßte also um die Aminosäure Lys verlängert sein. Aufgrund der Endgruppenbestimmung (Ser und Lys) und der Aminosäureanalysen kamen für T-MTPI-f folgende Aminosäuregruppierungen am N-Terminus in Frage:

f_2: 1 Lys-Val
2 Lys-Ser-Val

f_1: 3 Ser-Val
4 Ser-Lys-Val

Unter der Annahme, daß beide Komponenten dieselbe Sequenz besitzen, kommen nur die Kombinationen 1 und 4 oder 2 und 3 in Frage. Da die Aminosäureanalyse bei T-MTPI-f für Lys einen um 0,9, für Ser jedoch einen nur wenig gegenüber T-MTPI-d erhöhten Wert ergab, erschien die Kombination 1 und 4 wahrscheinlicher. Denn in diesem Fall mußte dann der Wert für Lys sowohl bei Komponente 1 wie 4 gegenüber T-MTPI-d um 1 erhöht sein, während der für Ser abhängt von dem Anteil der Komponente 4 in Fraktion

T-MTPI-f. Die Richtigkeit dieser Folgerung ergab sich bei der Sequenzermittlung der tryptischen Peptide. Es wurde nämlich ein Peptid Ser-Lys gefunden, jedoch keines mit der Folge Ser-Val. Damit waren 2 und 3 als mögliche Endgruppierungen der beiden Komponenten von f mit Sicherheit ausgeschlossen.

Auch in Fraktion T-MTPI-e mußten 2 Komponenten enthalten sein, die eine mit Phe, die andere mit Ala als Endgruppe. Da sowohl in T-MTPI-d wie in T-MTPI-f kein Ala enthalten ist, mußten diejenigen tryptischen Peptide, welche Ala enthielten, die N-terminalen Gruppierungen der beiden Komponenten von T-MTPI-e darstellen. Zwei solche Peptide wurden gefunden und sequenziert, nämlich Phe-Ala-Pro-Ser-Lys und Ala-Pro-Ser-Lys. Damit stimmt überein, daß die Aminosäureanalyse von T-MTPI-e für Phe,Ala,Pro und Ser etwa um 1 erhöhte Werte gegenüber T-MTPI-f ergab. Da der Wert von Ala um etwa 1,4 Reste höher liegt, konnte nicht ausgeschlossen werden, daß auch eine Komponente der Gruppierung Ala-Phe-Ala-Pro-Ser-Lys in T-MTPI-e enthalten war, jedoch konnte kein Peptid dieser Sequenz erfaßt werden.
Eine zusätzliche Absicherung dieser Ergebnisse aus den Ausbeuten der Peptide war nicht möglich, da bei der Peptidtrennung mittels Papierchromatographie hohe Verluste auftraten. Ein quantitativer Vergleich war damit ausgeschlossen.

Der aus Meerschweinchensamenblasen durch Bindung an Trypsin-harz isolierte Trypsin-Plasmin-Inhibitor T-MTPI enthält mindestens 5 Komponenten. Eine Komponente hat als Endgruppe Val, die anderen leiten sich davon ab durch Verlängerung der Polypeptidkette am N-Terminus um 1 - 5 Aminosäuren (Tab.9).

Tab.9: N-terminale Aminosäuresequenzen von fünf Komponenten des T-MTPI

T-MTPI-d	Val-
T-MTPI-f_1	Lys-Val-
T-MTPI-f_2	Ser-Lys-Val-
T-MTPI-e_1	Ala-Pro-Ser-Lys-Val-
T-MTPI-e_2	Phe-Ala-Pro-Ser-Lys-Val-

Dieses Ergebnis macht eine erste Korrektur der aus der Summe der Peptide gewonnenen Aminosäurezusammensetzung erforderlich, da die Aminosäuren der N-terminalen tryptischen Peptide zum Teil mehrmals gezählt wurden (Tab.10, Spalte 3).

Eine weitere Korrektur ist notwenig, da durch nicht vollständig verlaufende atypische tryptische Spaltung überlappende Peptide entstanden sind.

Tab.10: Aminosäurezusammensetzung von T-MTPI-e

Vergleich der Gesamtanalyse mit den Werten aus der Summe der tryptischen Peptide (Erläuterung siehe Text)

Amino-säure	T-MTPI-e_2	Summe der AS aus den Peptiden	nach 1. Korrektur	nach 2. Korrektur
Asp	6	6	6	6
Thr	4	4	4	4
Ser	6	8	6	5
Glu	4	4	4	4
Pro	3	4	3	3
Gly	5	6	6	5
Ala	1	2	1	1
Cys	6	3	3	3
Val	3	3	3	3
Met	1	1	1	1
Ile	1	-	-	-
Leu	3	3	3	3
Tyr	4	5	5	4
Phe	4	3	3	3
Lys	5	7	4	4
His	3	4	4	3
Arg	4	5	5	4

T-8 Phe-Thr-Phe-Ser-His-Tyr

T-4.1 Ser-His-Tyr-Gly-Arg

T-2.31 Gly-Arg

Phe-Thr-Phe-Ser-His-Tyr-Gly-Arg

Die Aminosäuren der überlappenden Bereiche, nämlich Ser,His,Tyr,

Gly und Arg wurden bei der Berechnung der Summen der Aminosäuren aus den Peptiden zweimal gezählt. Das Peptid Phe-Thr-Phe, das ebenfalls zu erwarten wäre, wurde nicht erfaßt. T-8 und T-4.1 müssen überlappende Peptide sein, da nur 3 Histidylreste im Inhibitormolekül auftreten und die beiden anderen Histidylgruppen in eindeutig unterscheidbaren Peptiden enthalten sind (Tab.10, Spalte 4).

Trotz dieser beiden Korrekturen bestehen immer noch Abweichungen in den Summen mehrerer Aminosäuren aus den Peptiden von den Werten der Analyse jener Komponente mit der längsten Polypeptidkette (T-MTPI-e_2). Bei 5 Aminosäuren liegen zu niedrige Werte vor, nämlich bei Cys eine Differenz von 3, bei Ile, Phe, Ser und Lys eine Differenz von 1.

Bei der Papierchromatographie der Fraktion T-3 wurde eine Fraktion T-3.3 isoliert, die in der Hauptsache CM-Cys, Ile, Lys, Phe, Ser enthält, also jene Aminosäuren, bei denen Differenzen zur Gesamtanalyse bestehen. Bisher ist es nicht gelungen, diese Fraktion noch weiter aufzutrennen, eine Sequenz zu gewinnen oder Endgruppen eindeutig zu bestimmen.

Aus Meerschweinchensamenblasen wurden 5 Komponenten eines Trypsin-Plasmin-Inhibitors gewonnen, die sich in ihrer Kettenlänge und damit in ihrer Aminosäurezusammensetzung etwas unterscheiden,

und zwar sind die Komponenten T-MTPI-e_1, T-MTPI-e_2, T-MTPI-f_1 und T-MTPI-f_2 gegenüber Komponente T-MTPI-d am N-terminalen Ende verlängert. Die kürzeste Komponente kann während der selektiven Bindung des Inhibitors an Trypsinharz aus jeder anderen entstanden sein, da das Restpeptid der übrigen Komponenten mit der allen gemeinsamen Peptidkette von 58 Aminosäuren durch eine Lys-Val-Bindung verknüpft und damit der tryptischen Spaltung zugänglich ist.

Für Komponente T-MTPI-e_1, bei der nur das endständige Phe der Komponente T-MTPI-e_2 fehlt, ist eine Bildung durch unspezifische tryptische oder durch chymotryptische Spaltung (bedingt durch verunreinigendes Chymotrypsin des Trypsinharzes) möglich. Bei allen übrigen Komponenten scheiden diese Erklärungen aus. Ihr Auftreten könnte Ausdruck mehrerer Strukturgene sein. Greene (37) diskutiert so zwei spezifische Trypsininhibitoren im Schweinepankreassekret, in diesem Fall ist die eine Komponente gegenüber der anderen am N-Terminus um ein Tetrapeptid verlängert. Tschesche konnte diesen Befund bestätigen (93a).

Da der Inhibitor aus einer Vielzahl von Individuen gewonnen wurde, ist auch ein individueller Unterschied der verantwortlichen Strukturgene möglich.

Des weiteren kann das Auftreten der Komponenten auch durch evt. vorhandene Aminopeptidasen erklärt werden, wie sie z.B. im Hu-

nansperma nachgewiesen werden (90).

Im Hemmverhalten der einzelnen Inhibitorkomponenten wurden keinerlei Unterschiede festgestellt.

3.4 Modifizierung von nativem Meerschweinchensamenblasen-Trypsin-Inhibitor

Komponente a des über Trypsinharz isolierten Trypsininhibitors wird bei Inkubation mit Carboxypeptidase B parallel zur Freisetzung von Arginin nahezu völlig (ca.94%) inaktiviert (Tab.18). Diese Inaktivierung ist aufgrund einer gespaltenen Arg-X-Bindung des reaktiven Zentrums möglich.

Ausgehend vom nativen Inhibitor, der ohne Verwendung von Trypsinharz gewonnen wurde, untersuchten wir die pH-Abhängigkeit dieser Modifizierung des Inhibitors durch Trypsin im Bereich der pH-Werte von 1,5 bis 8,0 (Abb.6).
Der Inhibitor wurde zuerst 23,5 Std. mit 2 Molprozent an TPCK-behandeltem Trypsin und nach Zugabe von Tris-Puffer (pH 8,0; 0,2 M) und Carboxypeptidase B weitere 18 Std. bei 25°C inkubiert. Da nicht modifizierter Inhibitor unter diesen Bedingungen durch Carboxypeptidase B nicht inaktiviert wurde, kann aus der Restaktivität an Inhibitor das Ausmaß der Modifizierung durch Trypsin bestimmt werden (vgl.dazu 82,84).

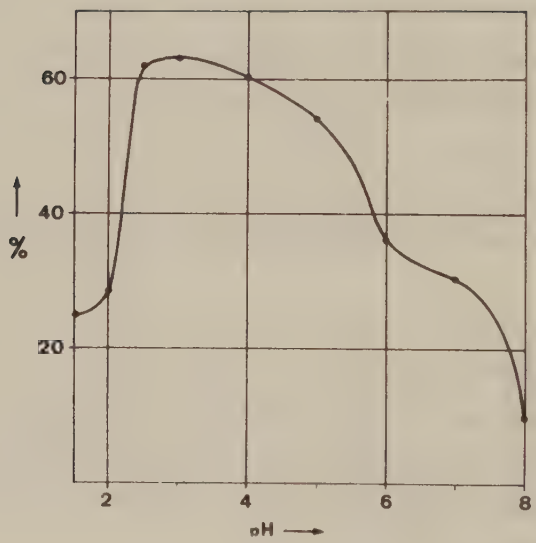

Abb.6: Modifizierung des nativen Trypsininhibitors mit 2,3 Mol% Trypsin in Abhängigkeit vom pH-Wert

Ordinate: Prozentualer Anteil des modifizierten Inhibitors nach Inkubation mit Carboxypeptidase B

Abszisse: pH-Wert der Inkubationslösung

Versuchsdurchführung:

a) Modifizierung: 0,05 ml der Inhibitorlösung, enthaltend 1,5 IU bzw. 53 nMol des nativen Trypsininhibitors in 0,1 M NaCl, wurden versetzt mit 0,037 ml Trypsinlösung, enthaltend 37 g bzw. 1,15 nMol TPCK-behandeltes Trypsin der Fa. Merck und 0,213 ml Pufferlösung (0,04 M an $CaCl_2$) des entsprechenden pH-Wertes (pH 1,5-2,0: 0,02 M KCl/HCl; pH 5,0 und 6,0: 0,02 M Natriumacetat; pH 7,0 und 8,0: 0,02 M Tris/HCl). Nach der Bestimmung

der Inhibitoraktivität wurden die Ansätze 23,5 h bei 25°C inkubiert. Die Inhibitoraktivität war danach in allen Ansätzen unverändert.

b) Inkubation mit Carboxypeptidase B: Die Modifizierungsansätze wurden nun mit je 0,3 ml 0,2 M Tris/HCl, pH 8,0 und 22,8 g DFP-behandelter Carboxypeptidase B in 0,03 ml Lösung (vgl. Tab.18) versetzt und die Mischung nochmals 18 h bei 25°C inkubiert. Danach wurde ihre Hemmaktivität gegenüber Trypsin bestimmt. Aus dem Verlust an Hemmaktivität (in mIU) im Ansatz wurde der prozentuale Anteil des modifizierten Inhibitors berechnet (vgl. Tab.18).

i Kontrollversuchen war festgestellt worden, daß der native In-
.bitor bei Inkubation mit 2,3 Mol% TPCK-behandeltem Trypsin bis
ı 65 Std. nicht an Aktivität verliert. Wurde Trypsin eingesetzt,
ıs nicht mit TPCK behandelt war, so traten schon bei 40stündiger
ıkubation Verluste bis zu 20% auf. Sie dürften auf verunreinigen-
es Chymotrypsin zurückzuführen sein. Bei Inkubation mit TPCK-be-
andeltem Trypsin und Carboxypeptidase B (ohne Vorinkubation mit
rypsin) bei pH 8,0 war nach 41 Std. nur ein Verlust von 5,5% ein-
etreten. Die zusätzliche Inaktivierung während der 18stdg. Inku-
ation mit Carboxypeptidase B im 2.Teil der Versuche darf demnach
ernachlässigt werden.

it der gleichen Methode haben Rigbi und Greene die pH-Abhängig-
eit der Modifizierung des Trypsininhibitors aus Rinderpankreas
ntersucht (84).

Ein anderes Verfahren wandte Tschesche an, um die pH-Abhängigkeit dieser Reaktion am Trypsininhibitor aus Schweinepankreas aufzuklären (93). Nach der Inkubation mit 50% Trypsin trennte er den Inhibitor durch Gelfiltration in saurer Lösung vom Enzym und bestimmt den Anteil der einzelnen Komponenten nach elektrophoretischer Auftrennung.

Rigbi und Greene (84) fanden beim Inhibitor aus Rinderpankreassekret ein scharfes pH-Optimum bei 2,7. Beim Meerschweinchensamenblasen-Trypsininhibitor (Komponente O-MTI-d) ist das Optimum nicht scharf ausgeprägt. Zwischen pH 2,5 und 4 ist das Ausmaß der Umsetzung nahezu konstant, 60 bis 63% des mit Trypsin inkubierten Inhibitors können durch Carboxypeptidase B inaktiviert werden.

Die im Sauren ablaufende Hydrolyse von Peptidbindungen durch katalytische Mengen von Trypsin wurde erstmals von Ozawa und Laskowski (82) am Sojabohnen-Trypsininhibitor und Ovomucoid-Trypsininhibitor festgestellt. Es scheint, daß es sich um eine für Trypsininhibitoren charakteristische Eigenschaft handelt, Untersuchungen an weiteren Inhibitoren stehen jedoch noch aus.

3.5 Untersuchungen am reaktiven Zentrum verschiedener Inhibitoren

3.5.1.1 Hemmzentrum von Trypsininhibitoren

Nach neueren Untersuchungen ist für die Hemmwirkung der Trypsininhibitoren ein "reaktives Zentrum" wesentlich verantwortlich. Die Hemmaktivität beruht nicht auf "unspezifischer" Adsorption des Inhibitormoleküls an das Enzym. Das Hemmzentrum stellt einen Lysyl- oder Arginylrest dar, bzw. eine Peptidsequenz, die einen dieser Reste enthält (16-18,46,47,50,82).

3.5.1.2 Prinzip der Untersuchungen

Es wurde untersucht, welchen Einfluß die Modifizierung der ε-Aminogruppen der Lysylreste, bzw. der Guanidinogruppen der Arginylreste auf die inhibitorische Aktivität einer größeren Anzahl von Proteinasen-Inhibitoren hat. Die Aminogruppen von Proteinen wurden mit Maleinsäureanhydrid reversibel acyliert und anschließend mit Hilfe eines Butandion-(2,3)-Reagens (41) spezifisch die Arginylreste modifiziert. Durch saure Hydrolyse ließen sich nach der Umsetzung mit dem Diketon die Maleoylreste wieder abspalten. Das Endprodukt ist dann der spezifisch an den Guanidinogruppen der Arginylreste modifizierte Inhibitor.

3.5.1.3 Untersuchte Hemmstoffe

In Tabelle 11 sind die bei den Untersuchungen eingesetzten Hemmstoffe und ihre Herkunft angegeben.

Tab.11: Trypsininhibitoren: Hersteller- und Bezugsquellennachweis

Trypsininhibitor aus	Hergestellt nach bzw. Bezugsquelle
Pankreas von	
Schwein	Fritz u. Mitarb. (24,26)
Hund	Fritz u. Mitarb. (24,26)
Katze	Fritz u. Mitarb. (22,24,26)
Schaf	Fritz u. Mitarb. (22)
Meerschweinchen-samenblasen	
I: Trypsininhibitor	Fritz u. Mitarb. (21,22)
II: Trypsin-Plasmin-Inhibitor	Fritz u. Mitarb. (21,22)
Gl.Submand. (Hund)	Fritz u. Mitarb. (25a)
Lunge von	"Trasylol", Farbenfabriken
Rind	Bayer, Werk Elberfeld
Schaf	Fritz u. Mitarb. (22,22a)
Hirudin "Bdellin"	Fritz u. Mitarb. (27a)
Weizenkeime I (Triticum vulgare)	Hochstraßer u. Mitarb. (56)
Roggenkeime I (Secale cereale)	Hochstraßer u. Mitarb. (56)
Weißbohnen (Phaseolus vulgaris)	Hochstraßer u. Mitarb. (57)
Kartoffeln I (Solanum tuberosum)	Hochstraßer u. Mitarb. (58)
Erdnuß PNT (Arachis hypogaea)	Hochstraßer u. Mitarb. (54)
Sojabohnen (Glycine soja)	pract.lyophil., Serva Heidelberg
Eiklar (Huhn) "Ovomucoid"	Worthington, Freehold
Limabohnen	M 2113,Mann Research, N.Y.
Inter-α-Trypsininhibitor (Humanserum)	Behringwerke, Marburg

Tab.12: Proteinasen-Inhibitoren, deren reaktives Zentrum auch durch andere Methoden bestimmt wurde.

Trypsininhibitor aus	Aminosäure bzw. Sequenz im Hemmzentrum	Autoren Lit.cit.
Sojabohnen	-Arg-Ile-	17,18,82,80
Hühnereiklar	-Arg-Ala-	82
Maiskeimen	-Arg-Leu-	57
Roggenkeimen	-Arg-Ala-	56
Weizenkeimen	-Arg-Ala-	56
Erdnuß	-Arg-Ala-	54
Rinderpankreas	-Arg-Ile-	84
Schafspankreas	-Arg-(Ile)-[a]	55
Schweinepankreas	-Lys-Ile-	93,93b,39a
Rinderlunge	-Lys-Ala-	11a
(Rinderpankreas)		
Schafslunge	-Lys-(Ala)-[a]	24a
Meerschweinchen-samenblasen I: Trypsin-Plasmin-Inhibitor	-Arg-X-	(s.Tab.18)

[a] Aufgrund identischer Aminosäurezusammensetzungen angenommen

3.5.2 Beeinflussung des Hemmverhaltens gegenüber Trypsin

Aufgrund des Hemmverhaltens der mit Maleinsäureanhydrid acylierten Inhibitoren gegenüber Trypsin (Substrat: BAPNA) waren zwei Gruppen zu unterscheiden, in die sich nur der aus Weißbohnen gewonnene Inhibitor nicht einordnen läßt.

3.5.2.1 Lysin-Inhibitoren

Diese Inhibitoren hatten nach der Acylierung der Aminogruppen ihre Hemmwirkung gegen Trypsin verloren. Die verbleibende Restaktivität von 3,4 bis weniger als 0,1% der eingesetzten Inhibitoraktivität wird durch Zugabe eines noch größeren Überschusses an Maleinsäureanhydrid weiter verringert. Sie ist also auf nicht quantitativen Verlauf der Umsetzung unter den gewählten Bedingungen zurückzuführen.

Tab.13: Lysin-Inhibitoren. Verbleibende Aktivität nach Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid (MA)
Die Versuchsdurchführung ist in Abschnitt 4.2.8.1 beschrieben.

Trypsininhibitor aus	Nach Umsetzung mit MA verbleibende Aktivität gegenüber % [a]			
	Trypsin	Plasmin	Chymotryp.	Kallikrein
Pankreas von				
Schwein	0,2			
Hund	0,1			
Katze	0,8			
Meerschweinchensamenblasen T-MTPI-e	2,2	3,3		
Lunge von				
Rind	0,6	1,7	1,2	1,0
Schaf	2,5	2,7	0,5	1,6
Hirudin "Bdellin"	3,4	2,5		
Limabohnen	1,9	1,9	112	
Weißbohnen	33			

[a] Bezogen auf die zur Umsetzung mit MA eingesetzte Aktivität

Tab.14: Lysin-Inhibitoren. Freisetzung der Trypsininhibitoren aus ihren Polymaleoyl-Derivaten

Die Reaktionsbedingungen sind im Abschnitt 4.2.6.2 beschrieben. Die in der zweiten Spalte angegebenen Mengen sind aus den bei der Herstellung der Polymaleoyl-Derivate eingesetzten Inhibitoraktivitäten berechnet.

Polymaleoyl-Derivat des Inhibitors aus	Eingesetzte Menge mIU	Freigesetzte Aktivität (in %[a]) in saurer Lösung nach verschieden langer Inkubationszeit (in Min.)					
		10	25	30	60	120	1200
Pankreas von							
Schwein	575	13			52	110	
Hund	740	9			53	75[b]	49
Katze	730	12			62	112	
Meerschweinchensamenblasen T-MTPI-e	934			65		67[b]	
Lunge von							
Rind	603	19			75	100	
Schaf	665					104	
Hirudin "Bdellin"	700	16	35		52	86	
Limabohnen	632			67		67[b]	<1

[a] Bezogen auf die zur Umsetzung mit Maleinsäureanhydrd eingesetzte Aktivität (Tab.13)

[b] Diese Inhibitoren werden unter den angewandten Bedingungen langsam inaktiviert: Gefundener Aktivitätsverlust der nicht modifizierten Inhibitoren in 3proz. Perchlorsäure bei 60°C nach 150 Min.: 13 -14%.

Durch Säureinwirkung werden die aktiven Hemmstoffe aus ihren inaktiven Polymaeoylderivaten wieder freigesetzt (Tab.14 und Abb.7). Die Hemmaktivität gegenüber Trypsin erreicht bei den säurestabilen Inhibitoren nach zweistündiger Inkubation in dreiprozentiger Perchlorsäure wieder den ursprünglichen Wert. Geringere Ausbeuten bei der Reaktivierung sind auf eine Zerstörung in der stark sauren Lösung zurückzuführen.

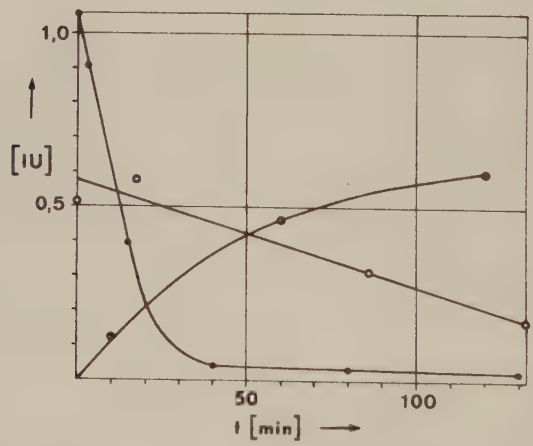

Abb.7: Inaktivierungsgeschwindigkeiten der Polymaleoyl-Derivate der Inhibitoren aus Schafspankreas (●——●) und aus Weißbohnen (o——o) bei Einwirkung des Butandion-(2,3)-Reagens sowie Freisetzungsgeschwindigkeit des Inhibitors aus Rinderlunge (●——●) aus dem Polymaleoyl-Derivat.

Die Versuchsdurchführung ist im Abschnitt Methodik beschrieben. Vg. dazu Tab.14 und 16.

3.5.2.2 Arginin-Inhibitoren

Bei dieser Gruppe bleibt nach der Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid die Hemmwirkung gegenüber Trypsin vollständig erhalten.

Tab.15: Arginin-Inhibitoren. Verbleibende Aktivität nach Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid und anschließender Reaktion mit dem Butandion-(2,3)-Reagens.

Die Reaktionsbedingungen sind im Abschnitt 4.2.8.3 beschrieben. Die Inaktivierungsgeschwindigkeit bei der Umsetzung mit dem Butandion-(2,3)-Reagens geht aus Tab.17 hervor; vgl. auch Abb.7;

Trypsininhibitor aus	Verbleibende Aktivität in %[a] nach Umsetzung mit			
	Maleinsäureanhydrid		Butandion-(2,3)-Reagens	
	Trypsin[b]	Plasmin[b]	Trypsin[b]	Reaktionszeit Min.
Schafspankreas	100		2	130
Gl.Submand.(Hund)	100	100	5	133
Meerschweinchensamenblasen T-MTI-a	32		3	210
Sojabohnen	106	99	3	210
Eiklar (Ovomucoid)	97	300	0,3	210
Weizenkeime I	100		4	132
Roggenkeime I	100		3	164
Weißbohnen[c]	33(36)[d]		34	132
Kartoffeln I	85(108)[d]		< 1,0	90
Erdnuß PNT	106(100)[d]	100	< 0,3	90
Inter-α-Trypsin-Inhibitor (Humanserum)	84		< 2,5	90

[a] Bezogen auf die zur Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid bzw. mit dem Butandion-(2,3)-Reagens jeweils eingesetzte Inhibitoraktivität.
[b] Substrat: BAPNA
[c] Lysin-Inhibitor; s. Text
[d] Die in Klammern angegebenen Werte wurden bei Ansätzen erhalten, bei denen die Umsetzung in Gegenwart von 6M Harnstoff durchgeführt wurde.

Eine geringe Zunahme der Aktivität (Inhibitoren aus Sojabohnen und Erdnüssen) ist evt. auf die Dissoziation von Polymeren zurückzuführen, eine geringe Abnahme (Inhibitor aus Kartoffel I und Inter-α-Trypsininhibitor) evt. auf eine teilweise Denaturierung bei der Umsetzung infolge des hohen Salzgehaltes der Lösungen. Die Polymaleoylderivate der Arginin-Inhibitoren verlieren dagegen bei der Umsetzung mit dem Butandion-(2,3)-Reagens relativ rasch ihre Hemmwirkung gegenüber Trypsin (Tab.15 und 16). Die Restaktivität beträgt nach eineinhalb bis zwei Stunden in allen Fällen weniger als 10% des Ausgangswertes und nimmt bei längerer Inkubation noch weiter ab.

Ein von diesen beiden Typen abweichendes Verhalten zeigte der Inhibitor aus Weißbohnen. Nach der Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid verlor er nur etwa zwei Drittel seiner Hemmwirkung gegenüber Trypsin, gemessen mit BAPNA als Substrat (Tab.13 und 15), mit Azocasein als Substrat liegt der Aktivitätsverlust in derselben Größenordnung. Die Restaktivität des Polymaleoylderivates nimmt bei der Reaktion mit dem Butandion-(2,3)-Reagens wesentlich langsamer ab als die der Polymaleoylderivate der Arginin-Inhibitoren (Tab.16 und Abb.7). Dies spricht dafür, daß für die verbleibende Hemmaktivität dieses Inhibitors eine Aminogruppe und nicht eine Guanidinogruppe verantwortlich ist. Demnach ist der Inhibitor aus Weißbohnen den Lysin-Inhibitoren zuzuordnen, wobei allerdings ein von den anderen Inhibitoren sich unterschei-

Tab.16: Arginin-Inhibitoren. Abnahme der Antitrypsinaktivität von Polymaleoyl-Derivaten bei der Umsetzung mit Butandion-(2,3)-Reagens (vgl.dazu Tab.15).

Die Versuchsdurchführung ist im Abschnitt 4.2.8.3 beschrieben.

Trypsininhibitor aus	Eingesetzte Inhibitoraktivität	Verbleibende Antitrypsinaktivität in % nach der jeweils(in Klammern) angegebenen Reaktionszeit in Min.											
	mIU/ml	%	Min.	%	Min.	%	Min.	%	Min.	%	Min.	%	Min.
Schafspankreas	1053	86	(3)			37	(15)	4	(39)	3	(79)	2	(130)
Gl.Submand. (Hund)	500							12	(87)			7	(123)
Meerschweinchen-samenblasen I T-MTI-a	352			69	(9)					8	(101)		
Sojabohnen	1252			72	(7)					5	(99)		
Eiklar (Ovomucoid)	1000			75	(8)					9	(100)		
Weizenkeime I	653					78	(17)	9	(85)			4	(132)
Roggenkeime I	804							15	(65)			3	(164)
Weißbohnen	503							63	(86)			34	(132)
Kartoffeln I	600									1	(90)		
Erdnuß PNT	3000									0,3	(90)		
Inter-α-Trypsin-inhibitor (Humanserum)	140									2,5	(90)		

dender Hemmechanismus zu diskutieren ist.

Auch bei dem aus Meerschweinchensamenblasen über Trypsinharz isolierten spezifischen Trypsininhibitor blieb nach der Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid ein Drittel der Hemmaktivität erhalten, die jedoch, anders als beim Weißbohnen-Inhibitor, bei der Umsetzung mit dem Butandion-(2,3)-Reagens ebenso rasch wie bei den Arginin-Inhibitoren verschwand (20). Die Vermutung lag nahe, daß dieser Inhibitor zwei reaktive Zentren besitzt, ein Lysin- und ein Arginin-Hemmzentrum (20).

WeitereUntersuchungen ergaben, daß der Meerschweinchensamenblasen-Trypsininhibitor durch Carboxypeptidase B inaktiviert wurde (94% Verlust an Hemmaktivität, s.Tab.18), das bedeutete, daß die Lys-X- bzw. Arg-X-Bindungen des reaktiven Zentrums bei der Reaktion mit dem wasserunlöslichen Trypsinharz gespalten worden war (82).

Wie die Aminosäureanalyse des Inkubationsansatzes zeigte, verläuft die Inaktivierung des Inhibitors parallel zur Abspaltung von Arginin. Aus 1 Mol T-MTI-a wurden unter gleichzeitigem Verlust von 94 -95% an Aktivität 0,9 Mol Arginin gegenüber nur 0,19 Mol Lysin freigesetzt.
Damit war klar, daß dieser Inhibitor der Gruppe der Arginin-Inhibitoren angehört. Die weitgehende Inaktivierung bei der Umsetzung

mit Maleinsäureanhydrid kann dann nur bedingt sein durch die Acylierung der α-Aminogruppe der Aminosäure X an der Spaltstelle des reaktiven Zentrums.

Der endgültige Beweis konnte erbracht werden, nachdem der Inhibitor ohne Trypsinharz isoliert worden war. Dieser Inhibitor verlor weder bei der Inkubation mit Carboxypeptidase B noch beim Acylieren mit Maleinsäureanhydrid seine Hemmwirkung gegenüber Trypsin (Tab.18). Erst bei der Umsetzung mit dem Butandion-(2,3)-Reagens wurde das Polymaleoylderivat des Inhibitors inaktiviert.

3.5.3 Beeinflussung des Hemmverhaltens polyvalenter Inhibitoren

Die Inhibitoren aus Lunge von Rind und Schaf, der Trypsin-Plasmin-Inhibitor aus Meerschweinchensamenblasen und der Inhibitor "Bdellin" aus Hirudin (Tab.13) verlieren bei der Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid nicht nur ihre Hemmwirkung gegenüber Trypsin, sondern - innerhalb der methodischen Fehlerbreite - im gleichen Maße auch gegenüber Plasmin, Chymotrypsin und Kallikrein. Derselbe Befund trifft auch für die Plasmin-hemmende Wirkung des Limabohnen-Inhibitors zu, während seine antichymotryptische Aktivität nicht verändert wird. Bei der Säurebehand-

lung der fünf genannten Inhibitoren verläuft die Freisetzung der trypsinhemmenden Wirkung (Tab.14) in allen Fällen parallel zur Freisetzung der Hemmaktivität gegenüber den anderen in Betracht kommenden Proteasen.

Bei den Arginin-Inhibitoren aus Gl.Submand. des Hundes, aus Sojabohnen und aus Erdnüssen bleibt dagegen die Plasmin- wie die Trypsin-hemmende Wirkung nach Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid voll erhalten (Tab.15). Die Einwirkung des Butandion-(2,3)-Reagens auf die Polymaleoyl-Derivate dieser drei Inhibitoren vermindert ihre Antiplasminaktivität (innerhalb der methodischen Fehlergrenzen) parallel zur Antitrypsinaktivität (Tab. 16 und 17).

Tab.17: Arginin-Inhibitoren. Abnahme der Antiplasminaktivität der Polymaleoyl-Derivate bei der Umsetzung mit dem Butandion-(2,3)-Reagens.

Inhibitor aus	Verbleibende Antiplasminaktivität in % nach der Reaktionszeit von		
	10 Min.	100 Min.	17 Std.
Gl.Submand.	28	8,5	<5
Sojabohnen	42	5	<2
Erdnuß PNT	32	4	<2

Für die Antiplasminwirkung dieser drei Inhibitoren ist demnach, ebenso wie für die Trypsinhemmung, ein Argininrest wesentlich.

Beim Inhibitor aus Eiklar (Ovomucoid) könnte die starke Zunahme der Plasmin-hemmenden Wirkung nach Substitution der Aminogruppen (vgl.Tab.15) auf die Dissoziation von Polymeren zurückzuführen sein. Die antichymotryptische Aktivität des Inhibitors aus Gl.Submand. wird weder durch die Acylierung der Aminogruppen, noch durch die Modifizierung der Arginin-Reste beeinträchtigt: Vor der Reaktion mit Maleinsäureanhydrid hemmt 1 mg dieses Inhibitors die Aktivität von 1,61 mg Chymotrypsin, danach die von 1,54 mg und nach Modifizierung der Guanidinogruppen die von 2,05 mg Chymotrypsin. Dieser Inhibitor hat demnach zwei reaktive Zentren, das eine ist spezifisch für Trypsin, das andere für Chymotrypsin.

Haynes, Feeney u. Mitarb. modifizierten bei einer Reihe von Inhibitoren spezifisch die Aminogruppen mit 2,4-Dinitrobenzolsulfonsäure und die Guanidinogruppen mit Cyclohexandion-(1,2) um einen Einblick in die Art des reaktiven Zentrums zu erhalten. Sie fanden, daß durch die selektive Blockierung der Aminogruppen (α und ε) die Hemmwirkung der Lysin-Inhibitoren (Inhibitor aus Limabohnen und aus Rindercolostrum, Inhibitoren aus Eiklar von Kasuar, Ente, Pinguin und Truthahn) gegenüber Trypsin verloren geht, während die Hemmaktivität von Arginin-Inhibitoren (Inhibitor aus Sojabohnen und Hühnereiklar) unverändert erhalten bleibt (46,50). Nach der Reaktion mit Cyclohexandion-(1,2) sind die genannten Arginin-Inhibitoren zu 80% inaktiviert, die Lysin-Inhibi-

toren nur zu 0 - 33% (76).

Die Ergebnisse von Haynes, Feeney u. Mitarb. und unsere Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß die genannten Vorstellungen über das reaktive Zentrum (s.Abschnitt 2.3) von Proteinasen-Inhibitoren allgemeine Gültigkeit besitzen. Die in Tab.13 angegebenen Lysin-Inhibitoren sind nach Acylierung der Aminogruppen mit den negativ geladenen Maleoylresten nahezu vollständig inaktiviert, während die Aktivität der Arginin-Inhibitoren (Tab. 15) davon nicht oder nur wenig beeinflußt wird. Die polymaleoylierten Arginin-Inhibitoren (Tab.15) werden andererseits durch das nach erfolgter Blockierung der Aminogruppen nun spezifisch die Guanidinogruppen der Argininreste modifizierende Butandion-(2,3)-Reagens relativ rasch und nahezu völlig inaktiviert (Tab. 15 und 16). Die bei direkter Verwendung von Cyclohexandion-(1,2) auftretenden Nebenreaktionen (47) mit den Aminogruppen (41) werden dadurch vermieden.

Die polyvalenten Lysin-Inhibitoren in Tab.13 verlieren bei der Acylierung der Aminogruppen nicht nur ihre Hemmwirkung gegenüber Trypsin, sondern auch gegenüber Plasmin, Chymotrypsin und Kallikrein. Nur beim Inhibitor aus Limabohnen bleibt die antichymotryptische Wirkung erhalten. Diese und weitere Versuchsergebnisse (26a) sprechen dafür, daß für die Antiplasminwirkung und auch - soweit zutreffend - für die Antikallikreinwirkung dieser Inhibi-

toren derselbe Lysinrest das reaktive Zentrum darstellt. Beim Inhibitor aus Limabohnen ist die antichymotryptische Wirkung evt. an einen aromatischen Aminosäurerest gebunden. Der Verlust der antichymotryptischen Wirkung nach Maleoylierung der polyvalenten Inhibitoren aus Lunge von Rind und Schaf kann noch nicht erklärt werden.

Die drei Inhibitoren aus Gl.Submand., Sojabohnen und Erdnüssen besitzen nach der Maleoylierung noch ihre volle Antiplasminwirkung (Tab.15). Sie verlieren diese erst, analog zur Antitrypsinwirkung, bei der Umsetzung mit dem Butandion-(2,3)-Reagens. Für beide Wirkungen dürfte deshalb bei jedem der drei genannten Inhibitoren dasselbe reaktive Zentrum, nämlich ein Argininrest, zuständig sein.

3.5.4 Beeinflussung des Hemmverhaltens bei modifizierten Inhibitoren (gespaltene Arg-X- bzw. Lys-X-Bindung des reaktiven Zentrums).

Haynes und Feeney (49) blockierten die freien -Aminogruppen im reaktiven Zentrum modifizierter Arginin-Inhibitoren (Arg-X-Bindung gespalten) durch Umsetzung mit 2,4-Dinitrobenzolsulfonsäure. Der Inhibitor aus Sojabohnen verliert dabei rasch, der aus Hühnereiklar nur langsam seine Hemmwirkung. Erfolgte die Umsetzung nach vorheriger Amidierung der modifizierten Hemmstoffe (Acylierung der α-Aminogruppe mit einem Acetimidoylrest), so

Tab.18: Umsetzung des Trypsininhibitors aus Meerschweinchensamenblasen mit Maleinsäureanhydrid bzw. Carboxypeptidase B.

a) Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid (MA)

Inhibitor	Anfangsaktivität im Ansatz	zugegebene Menge an MA	verbleibende Hemmaktivität
	mIU	mg	%
MTI'	2450	10	32
	1205	15	15
		+10	7
	724	20	9
		+10	6
MTI	752	20	104

b) Inkubation mit Carboxypeptidase B

Inhibitor	Anfangsaktivität im Ansatz	verbleibende Hemmaktivität
	mIU	%
MTI'	1206	5,0
	422	6,0
MTI	541	98
	541	94

MTI: Komponente b des ohne Trypsinharz isolierten Inhibitors
MTI': Komponente a des mit Trypsinharz isolierten Inhibitors (Arg-X-Bindung ist gespalten)
Reaktionsbedingungen: s. Abschnitte 4.2.8.1 und 4.2.9.3

trat kein Aktivitätsverlust auf.

Die von uns untersuchten pflanzlichen Inhibitoren lagen auf Grund der Isolierung über wasserunlösliche Trypsinharze weitgehend in ihrer modifizierten Form vor. Die Maleoylierung der α-Aminogruppen des Leucin- bzw. Alaninrestes im reaktiven Zentrum (Tab.12) hat offensichtlich keinen Einfluß auf die Hemmaktivität dieser Inhibitoren (Tab.13). Im Gegensatz dazu wird der modifizierte Trypsininhibitor aus Meerschweinchensamenblasen durch Acylierung mit Maleinsäureanhydrid inaktiviert. Die Inaktivierung verläuft weit weniger bereitwillig als bei Lysin-Inhibitoren (Tab.18), erst bei Anwendung eines großen Überschusses an Maleinsäureanhydrid werden bis zu 94% der Inhibitoraktivität aufgehoben.

Haynes und Feeney zeigten (49), daß es bei der Substitution eines Wasserstoffatoms der α-Aminogruppe entscheidend von der Art des Substituenten abhängt, ob die Hemmwirkung beeinträchtigt wird. Nach unseren Ergebnissen darf daraus jedoch nicht abgeleitet werden, daß ein Substituent bei allen Inhibitoren in gleicher Weise wirksam ist, wesentlich ist auch die Art des Inhibitors. Obwohl die Maleoylierung der α-Aminogruppe in allen anderen Fällen keinen Einfluß auf die Inhibitoraktivität hatte, wurde doch in einem Fall der Inhibitor durch dieselbe Modifizierung praktisch völlig inaktiviert.

4 Material und Methoden

4.1 Material

Enzyme

Trypsin (EC 3.4.4.4), Novo Industri, Kopenhagen, 23,5 AE/g, 4365 NF/mg, krist., lyophil.;
Die Bestimmung nach der Methode von Chase und Shaw (10b) ergab, daß 10 µg des Trypsins 0,34 ± 0,07 nMol aktives Enzym enthielten, dies entspricht einer Aktivität von 9,6 mU bei der Bestimmung mit BAPNA (s.unten);

Plasmin (EC 3.4.4.14), Novo Industri, Kopenhagen, 2,77 Novo Einheiten/mg, lyophil.;
3 mU bei der Spaltung von BAPNA (s.unten) entsprechen 1,58 nMol aktivem Plasmin, das sind ca. 0,7 Novo Einheiten. Die Molarität einer Plasminlösung kann durch Hemmversuche mit einer Lösung bekannter Molarität an Kunitz-Inhibitor aus Rinderlunge bestimmt werden. Mit diesem Inhibitor bildet Plasmin einen 1:1 Komplex. Die Molarität der Inhibitorlösung wird mittels einer nach Chase und Shaw titrierten Trypsinlösung (s.oben) eingestellt (auch mit Trypsin bildet der Kunitz-Inhibitor einen 1:1 Komplex).

Chymotrypsin (EC 3.4.4.5), Novo Industri, Kopenhagen, 1100 NF/mg, krist., lyophil.;

Carboxypeptidase A (EC 3.4.2.1), Fluka AG;

Carboxypeptidase B (EC 3.4.2.2), Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri;

Aminopeptidase M, Röhm u. Haas GmbH, Darmstadt;

Kallikrein (EC 3.4.4.21), Farbenfabriken Bayer AG;

Thrombin (EC 3.4.4.13)

Substrate

N-Succinyl-L-phenylalanin-4-nitroanilid, SUPHEPA, Mann Res.Lab., New York;

N-α-Benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilid-hydrochlorid, BAPNA, Merck;

Azocasein, Pentex PP 6262, Fluka AG;

N-α-Benzoyl-DL-arginin-äthylester, BAEE, Merck;

Reagentien

Triäthanolamin-hydrochlorid, EGA-Chemie;

Maleinsäureanhydrid, Schuchardt;

Butandion-(2,3), EGA-Chemie;

Alle anderen Reagentien: Merck; Reinheitsgrad: p.A.;

Trypsinharz

Zur Abtrennung der Inhibitoren aus den mit Perchlorsäure behandelten Extrakten wurde ein an eine polyamphotere Harzmatrix gebundenes Trypsin eingesetzt. Die Harzmatrix leitet sich von ei-

nem Kopolymer aus Äthylen und Maleinsäureanhydrid ab. Die Enzymmoleküle waren über Aminogruppen amidartig an das Kopolymer gebunden, die Ketten waren quervernetzt durch amidartig gebundenes Hexamethylendiamin. Um den anionischen Charakter zu vermindern wurde, ebenfalls in Säureamidbindung, N,N-Dimethyläthylendiamin in die Harzmatrix eingeführt (22).

4.2 Methoden

4.2.1 Bestimmung von Proteasen und Inhibitoren

Die Bestimmungen wurden nach bekannten Methoden durchgeführt.

Trypsin

a) Substrat: BAPNA

Das Substrat BAPNA wird durch Trypsin hydrolytisch gespalten. Die Geschwindigkeit der Freisetzung von p-Nitroanilid wird am Photometer bei 405 nm gemessen (14,23,28).

b) Substrat: Azocasein (28)

Chymotrypsin

Substrat: SUPHEPA

Die Geschwindigkeit der Umsetzung des Substrates wird wie bei BAPNA bestimmt (28,30).

Plasmin

a) Substrat: BAPNA (28)

b) Substrat: Azocasein (28)

Thrombin

Substrat: BAEE (28)

Bestimmung der Inhibitoraktivität

Zur Bestimmung der Inhibitoraktivität wurde eine bekannte Menge des Enzyms mit der inhibitorhaltigen Lösung in dem für den Enzymtest verwendeten Puffer 1 - 5 Minuten inkubiert. Die verbleibende Enzymaktivität wurde nach obiger Methode bestimmt (25,94).

Definition der Inhibitoreinheit:

1 IU (Inhibitor Unit) ist die Menge Inhibitor, die die Geschwindigkeit der Substratumsetzung unter Standardbedingungen um 1 µMol/min reduziert (92,94).

4.2.2 Gewinnung des Rohextraktes

Entnahme der Samenblasen

Möglichst unmittelbar nach der Tötung der männlichen Meerschweinchen durch Entbluten wurde die Bauchhöhle mit einer Schere in der Medianlinie eröffnet. Die paarig angelegten, schlauchartigen,

in ihrer Größe stark unterschiedlichen Samenblasen wurden bis zu ihrer Einmündung in die Urethra stumpf freipräpariert und entnommen. Sie enthalten ein gallertartiges Sekret.

Homogenat-Herstellung

Jeweils 700 - 800 g Samenblasen wurden nach Zugabe der 3-fachen Menge deionisierten Wassers bei 0 - 4°C homogenisiert. Unter Kühlung wurde zentrifugiert. Das Sediment wurde mehrmals mit einem Drittel der ursprünglich verwendeten Menge Wasser homogenisiert und zentrifugiert. Wenn in der Lösung nur noch etwa 10% der Inhibitorkonzentration des ersten Überstandes nachzuweisen waren, wurde derselbe Arbeitsgang mehrmals unter Verwendung 3%iger Perchlorsäure durchgeführt. Hierbei wurde etwa ein Viertel der Gesamtausbeute an Inhibitor gewonnen.

Enteiweißen des Homogenats

Das Homogenat wurde mit gleichen Volumen 6%iger Perchlorsäure versetzt und das ausgefällte Protein durch Zentrifugation abgetrennt. Der Verlust an antitryptischer Aktivität betrug etwa 50%. Mit 3%iger Perchlorsäure konnte aus dem Sediment etwa ein Fünftel der verlorenen Aktivität zurückgewonnen werden. Die perchlorsauren Extrakte wurden vereinigt und mit festem Kaliumhydrogencarbonat neutralisiert. Von ausgefallenem Kaliumperchlorat wurde nach mehrstündigem Stehen abfiltriert.

4.2.3 Isolierung der Inhibitoren aus dem Rohextrakt mittels wasserunlöslichem Trypsinharz

Selektive Bindung an Trypsinharz

Während des gesamten Arbeitsvorganges wurde bei 0 - 4°C gearbeitet.

Zu dem enteiweißten und neutralisierten Extrakt wurden je Liter 0,15 Mol Kaliumchlorid und 0,05 Mol Triäthanolamin-hydrochlorid gegeben. Das pH wurde mit 2 N NaOH auf 7,8 eingestellt.

Zu der Lösung wurde Trypsinharz gegeben, das pH wurde überprüft und evt. auf 7,8 nachgestellt. Nach etwa 30 Minuten rühren waren bis über 90% des Inhibitors an das Harz gebunden. Der Überstand wurde nach Zentrifugation der Harzsuspension verworfen. Zur Entfernung noch vorhandenen Fremdproteins wurde das mit Inhibitor beladene Trypsinharz 2 mal mit Puffer (0,05 M Triäthanolamin-hydrochlorid, 0,15 M KCl, 0,01 M $CaCl_2$, pH 7,8) eluiert.

Ablösung des Inhibitors vom Trypsinharz

Um den Inhibitor abzulösen wurde das Trypsinharz mit soviel KCl/HCl-Puffer (0,2 M KCl, pH 1,8 - 2,0) versetzt, daß eine dünnflüssige Suspension entstand. Nach 5 Minuten rühren wurde zentrifugiert. Der Arbeitsgang wurde so oft wiederholt, bis im Überstand kein Inhibitor mehr nachweisbar war. Zum Aufbewahren wurde die Lösung mit NaOH auf pH 5 - 5,5 eingestellt.

4.2.4 Ionenaustauschchromatographie an Sulfoäthyl-Sephadex

Sulfoäthyl-Sephadex C-25 wurde in die saure Form übergeführt und mit dem Anfangspuffer äquilibriert. Eluiert wurde bei konstantem pH von 5,4 mit Ammoniumacetatpuffer bzw. einem linearen Ammoniumacetat-Konzentrationsgradienten von 0,05 - 0,5 M. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug bei allen Versuchen etwa 10 cm/h.

Die Chromatographie an Sulfoäthyl-Sephadex wurde angewandt zur Auftrennung in die 2 Inhibitoren und zur Zerlegung eines jeden der Inhibitoren in seine Komponenten. Daher wurde mit unterschiedlichen Säulengrößen und Gradienten unterschiedlicher Steilheit gearbeitet.

Auftrennung in die Fraktionen I und II:
Säule: 3 x 30 cm, eingesetzte Menge an Inhibitor: etwa 1000 IU, Pufferkonzentration und Mengen: Jeweils 1 l NH_4Ac-Puffer, pH 5,4 der Konzentrationen 0,05 M und 0,5 M.
Die Bedingungen für die weitere Auftrennung der Fraktionen sind in den Legenden zu den Abb.2 und 3 angegeben.

4.2.5 Gelchromatographie

Entfernung hochmolekularer Eiweißstoffe aus dem Rohhomogenat. Um die beim Enteiweißen mit Perchlorsäure auftretenden Verluste zu vermeiden, wurde bei einer 2.Aufarbeitung das Homogenat durch Gelfiltration über Sephadex G 50 medium enteiweißt und dann gefriergetrocknet.

Elutionsmittel: 26,4 ml Collidin wurden mit Wasser auf 1 l aufgefüllt und mit Essigsäure auf pH 7,8 eingestellt;
Säule: 6 x 120 cm;

Entsalzung
Vor und nach der Ionenaustauschchromatographie wurden die inhibitorhaltigen Lösungen durch Ausschlußchromatographie entsalzt. Mit gleich gutem Erfolg wurde Bio-Gel P-2, 200 - 400 mesh und Sephadex G-25 fine angewandt. Als Elutionsmittel diente 5%ige Essigsäure. Nach der Gelfiltration wurden die Lösungen gefriergetrocknet.

4.2.6 Charakterisierung der Inhibitoren

4.2.6.1 Aminosäurezusammensetzung
Tryptophanbestimmung aus den UV-Spektren (31), Gerät: Leitz Unicam; Inhibitorkonzentration: 1 mg/ml; Küvetten: Quarz, Schichtdicke 10 mm;
Die Messung erfolgte nach 70stündiger Inkubation in 0,1 M NaOH.

Aminosäureanalysen siehe 4.2.7.5

4.2.6.2 Molekulargewichtsbestimmung
Die Molekulargewichtsbestimmung wurde mittels Gelfiltration über

Sephadex G-75, for gelfiltration, durchgeführt (29). Puffer: Natriumcitrat, 0,05 M pH 2,5; Eichsubstanzen: Kallikrein-Inhibitor (aus Rinderlunge), Ribonuklease, Chymotrypsinogen, Dextran-Blau; Säule: 1,8 x 123 cm; Elutionsgeschwindigkeit: 6 cm/h.

4.2.7 Isolierung und Sequenzierung der tryptischen Peptide von T-MTPI

4.2.7.1 Reduktion und Carboxymethylierung

Nach der Vorschrift von Crestfield und Mitarb. (12) wurden 120 mg Inhibitor mit 1,2 g Harnstoff in 1,3 ml Wasser gelöst, 0,1 ml 5%ige EDTA-Lösung, 1 ml Tris-Puffer, pH 8,3 (5,33 g Trishydrochlorid plus 9 ml 1 M HCl, verdünnt auf 30 ml), 0,1 ml Mercaptoäthanol, sowie 1,5 ml 8 M Harnstofflösung zugegeben. Nach 4 h bei 25°C wurden 450 mg Jodacetamid zugefügt und nach weiteren 90 Minuten über Bio-Gel P-2, 200 - 400 mesh entsalzt. Säule: 25 x 230 mm; Puffer: 10 ml Pyridin, 10 ml Collidin, 980 ml Wasser, mit Essigsäure auf pH 8,4 eingestellt.

4.2.7.2 Tryptische Spaltung

Reduzierter, carboxymethylierter Inhibitor (100 mg), wurde in verdünnter NaOH, pH 8,0 gelöst und mit 0,1 ml einer 0,6%igen Lösung von Trypsin in 0,001 M HCl versetzt. Zur Zerstörung von

Chymotrypsin war die Lösung 20 h bei 4°C inkubiert worden. Nach 1 h wurden nochmals 0,05 ml der Trypsinlösung zugegeben. Insgesamt wurde 6 Std. bei 37° C inkubiert. Das pH wurde von Zeit zu Zeit am pH-Meter kontrolliert und wenn nötig korrigiert.

4.2.7.3 Isolierung der Peptide

Ionenaustauschchromatographie an Dowex 1-X2

Nach der Vorschrift von Rudloff und Braunitzer (85) erfolgte die erste Auftrennung der tryptischen Peptide über Dowex 1-X2 mit einem Pyridin-Collidin-Puffer. Die Peptidfraktionen wurden durch Ninhydrintests nach alkalischer Hydrolyse festgestellt (52).

Papierchromatographie

Papier: Whatman 1; Laufmittel: n-Butanol : Essigsäure : Wasser : Pyridin = 15 : 3 : 12 : 10 (44); Anfärbung: Ninhydrin Sprühreagens (0,5%ig in Äthanol (44); 1%ige Amidoschwarz-Lösung in Essigsäure : Methanol = 1 : 9.

Bei der präparativen Reinigung durch Papierchromatographie wurde die Lage der Peptide ermittelt durch Anfärben zweier aus dem Chromatogramm entnommener Streifen. Die Peptide wurden aus dem Papier mit 1%iger Triäthanolaminlösung eluiert.

Hochspannungselektrophorese

Gerät: CAMAG-Hochspannungselektrophoresegerät; Papier: Whatman 1; Laufmittel: 4%ige Ameisensäure; Spannung: 2000 V; Zeit: 35 Min.;
Anfärbung, Bestimmung der Lage der Peptide bei der präparativen Durchführung und Elution aus dem Papier erfolgte wie bei der Papierchromatographie.

4.2.7.4 Endgruppenbestimmung und Sequenzierung
Zur Bestimmung der N-terminalen Gruppen von Inhibitoren und Peptiden wurden 1 - 10 nMol nach der Methode von Gray (32) mit 1-Dimethylaminonaphtalin-5-sulfonylchlorid (DNS-Cl) umgesetzt und in 6 M Salzsäure 15 h bei 110°C in zugeschmolzenen Reagensgläschen (8 x 70 mm) inkubiert. Die Identifizierung der markierten Aminosäuren erfolgte durch zweidimensionale Chromatographie auf Polyamidschichten (78,97).

Laufmittel: I) 1,5% Ameisensäure (97)
II) Benzol/Essigsäure 9:1 (97)
III) Essigsäureäthylester/Methanol/ Eisessig = 20 : 1 : 1 (8)

Sequenzen wurden durch Edman-Abbau in Verbindung mit der Endgruppenbestimmung nach der DNS-Methode bestimmt (33) und in manchen Fällen durch subtraktiven Edman-Abbau (65) bestätigt.

4.2.7.5 Aminosäureanalysen

1 mg Protein wurde in 2 ml 6 M HCl und unter Vakuum in zugeschmolzenen Glasröhrchen 20 - 120 h bei 110°C hydrolysiert. Die Säure wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck (11 - 15 mm Hg) entfernt.

Die Aminosäureanalyse der Hydrolysate wurde nach der Methode von Spackman, Stein und Moore (86) mit einem Beckman-Aminosäureanalysator durchgeführt. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels eines Beckman-Integrators.

4.2.8 Modifizierung der Lysin- und Argininreste von Inhibitoren (20)

4.2.8.1 Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid (10,10a)

a) 1 mg Inhibitor, 15 mg Natriumhydrogencarbonat und 10 mg gepulvertes Maleinsäureanhydrid wurden mit einem Glasstab in einem Zentrifugenglas verrieben und zu der Mischung 0,25 ml 0,1 M Natriumhydrogencarbonatlösung gegeben. Unter Eiskühlung (0 - 4°C) wurde die Suspension geschüttelt, bis eine klare Lösung entstand (ca. 10 Min.). Danach wurde mit 0,25 ml deionisiertem Wasser an der Glaswand haftende Teilchen in den Reaktionsansatz gespült. Nach 30 Min. Stehen bei Zimmertemperatur unter gelegentlichem Schütteln wurden Proben zur Bestimmung der Inhibitoraktivität in der Lösung entnommen.

b) Die Lösung von 1 mg Inhibitor in 0,5 ml 0,5 M Natriumhydrogencarbonatlösung wurde mit 10 mg gepulvertem Maleinsäureanhydrid versetzt, die Mischung unter Eiskühlung (0 - 4°C) 10 min. geschüttelt und danach 30 min. bei Zimmertemperatur unter gelegentlichem Schütteln stehengelassen. Anschließend wurde die Inhibitoraktivität in der Reaktionslösung bestimmt. Die Hemmaktivität in der Ausgangslösung war vor Maleinsäureanhydrid-Zugabe bestimmt worden.

c) Zu einer Lösung von Inhibitor (bis etwa 0,3 mg) in 1 ml 0,5 M Natriumhydrogencarbonatlösung wurden 15 mg gepulvertes Maleinsäureanhydrid gegeben und 10 Min. bei 0 - 4°C geschüttelt. Dann wurde eine Probe zur Bestimmung der Inhibitoraktivität entnommen. Der Reaktionsansatz wurde mit 10 mg gepulvertem Maleinsäureanhydrid versetzt und nach weiteren 10 Min. Schütteln bei 0 - 4°C die Inhibitoraktivität bestimmt.

4.2.8.2 Freisetzung der Inhibitoren aus ihren Polymaleoylderivaten (20)

0,1 ml des Reaktionsansatzes a) oder b) wurden mit 0,9 ml 3%iger Perchlorsäure versetzt und die Lösung bei 60°C inkubiert. Zu bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen und ihre Inhibitoraktivität bestimmt.

4.2.8.3 Umsetzung mit Butandion-(2,3)-Reagens (20,41)

Die Herstellung des Reagens erfolgte nach den Angaben von A. L. Grossberg und D. Pressman (41).
0,2 ml Inhibitorlösung (bis 3 IU enthaltend) bzw. 0,2 ml der Reaktionsansätze von a) oder b) wurden mit 0,2 ml 1 M Natriumhydrogencarbonat/Natriumcarbonat-Puffer, pH 8,6 und mit 0,2 ml des Butandion-Reagens versetzt, gut vermischt und bei 25°C inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und ihre Inhibitoraktivität bestimmt. Die Aktivität des beim Hemmtest vorgelegten Trypsins wurde durch das Butandion-Reagens nicht beeinflußt wie ein nach Zugabe von 0,2 ml Reagens gemessener Vergleichswert ergab.

4.2.9 Versuche mit Exopeptidasen

4.2.9.1 Aminopeptidase M

Etwa 0,1 Mol Peptid wurden in Natriumphosphatpuffer (0,067 M pH 7,5) gelöst, mit 0,05 ml einer 0,1%igen wäßrigen Lösung von Aminopeptidase M versetzt und 24 h bei 25°C stehengelassen (39).

4.2.9.2 Versuche mit Carboxypeptidase A

Die Lösung des Enzyms wurde hergestellt nach l.c.4.
0,1 Mol von Peptid T-9 wurden in 0,5 ml N-Äthylmorpholin-acetat-Puffer (0,2 M, pH 8,5) gelöst und mit 0,01 ml der Enzymlösung versetzt. Nach 3 h bei 35°C wurde die Probe gefriergetrocknet und die freigesetzte Aminosäure mittels Aminosäureanalysator identifiziert.

4.2.9.3 Versuche mit Carboxypeptidase B

Die Enzymsuspension wurde mit Tris-HCl-Puffer (0,2 M, pH 8,0) auf das 10fache verdünnt.

Die Inkubation wurde in 0,4 ml Tris-HCl-Puffer (0,2 M, pH 8,0) bei 25°C durchgeführt mit 1 - 2 Gewichtsprozent an Enzym.

5 Zusammenfassung

5.1 H. Haendle fand 1965 erstmals in Samenblasen und Sperma verschiedener Tiere und des Menschen Hemmaktivität gegenüber Trypsin und Plasmin. Diese Hemmstoffe spielen beim Befruchtungsvorgang offenbar eine wesentliche Rolle (43, 87,98). Deshalb begannen wir mit der eingehenden Charakterisierung des Proteinasen-Inhibitors in Meerschweinchensamenblasen. Der früher aus Meerschweinchensamenblasen isolierte Hemmstoff von Polypeptidcharakter (42) war, wie unsere Untersuchungen ergaben, nicht einheitlich.

5.2 Die Proteinasen-Inhibitoren aus Meerschweinchensamenblasen wurden von uns nach zwei Methoden isoliert: Mit Hilfe eines spezifischen Verfahrens durch selektive Bindung an wasserunlösliches Trypsinharz und mit üblichen chromatographischen Methoden.

Nach dem selektiven Bindungsschritt (Bindung des Inhibitors an das Trypsinharz, Auswaschen der Begleitsubstanzen mit Salz-Pufferlösungen, Dissoziation des unlöslichen Komplexes in schwach sauren Salzlösungen) wurde ein uneinheitliches Inhibitorpräparat mit relativ hoher spezifischer Aktivität erhalten.

Durch Chromatographie an Sulfoäthyl-Sephadex konnte das Inhibitorgemisch aufgetrennt werden in

1. spezifische Trypsininhibitoren (im wesentlichen 2 Fraktionen) und
2. Trypsin-Plasmin-Inhibitoren (im wesentlichen 5 Fraktionen).

5.3 Die Molekulargewichte beider Inhibitoren liegen bei 6 800 (bestimmt durch Gelfiltration und berechnet aus der Aminosäurezusammensetzung).

5.4 Hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung bestehen zwischen dem Trypsin- (MTI) und dem Trypsin-Plasmin-Inhibitor (MTPI) beträchtliche Unterschiede. Die beiden Komponenten des MTI haben identische Aminosäurezusammensetzungen, jedoch ist bei der einen Komponente die Arg-X-Bindung des reaktiven Zentrums gespalten. Vier der fünf Komponenten des MTPI leiten sich von der fünften ab durch Verlängerung der Polypeptidkette am N-Terminus um ein bis fünf Aminosäuren.

5.5 Der Trypsin-Plasmin-Inhibitor wurde nach Reduktion und Carboxymethylierung tryptisch gespalten. Die erhaltenen Peptide wurden isoliert und weitgehend sequenziert.

5.6 Auch bei der Isolierung mit chromatographischen Methoden, also ohne Verwendung von Trypsinharz (zur Vermeidung einer möglichen Modifizierung bei der Reaktion mit Trypsin) waren beide Inhibitoren nicht einheitlich. Die mit dem Trypsinharz-Verfahren isolierten verschiedenen Komponenten sind also keinenfalls allein auf proteolytische Spaltung durch das an Trägern fixierte Enzym zurückzuführen.

5.7 Der native Trypsininhibitor (Arg-X-Bindung intakt) wird durch Inkubation mit katalytischen Mengen Trypsin in eine modifizierte Form (Arg-X-Bindung gespalten) übergeführt. Das Ausmaß dieser Modifizierungsreaktion in Abhängigkeit vom pH der Inkubationslösung wurde bestimmt. Carboxypeptidase B inaktiviert den modifizierten Trypsininhibitor unter gleichzeitiger Freisetzung von Arginin.

5.8 Beide Inhibitoren hemmen die Aktivität von Chymotrypsin, Kallikrein und Thrombin gegenüber synthetischen Substraten nicht. Die Inhibitoren bilden mit Trypsin bzw. Trypsin oder Plasmin 1:1 Komplexe.
Die Hemmwirkung ist temporär, d.h. die Inhibitoren werden durch die von ihnen hemmbaren Enzyme abgebaut.

5.9 Bei einer Reihe von tierischen und pflanzlichen Inhibitoren

wurde die Zugehörigkeit zur Gruppe der sog. Lysin- bzw. Arginin-Inhibitoren (Lysin bzw. Arginin ist ein wesentlicher Bestandteil des reaktiven Inhibitorzentrums) aufgeklärt.

Freie α- und ε-Aminogruppen der Inhibitoren wurden mit Maleinsäureanhydrid acyliert. Dabei verloren die Lysin-Inhibitoren ihre Aktivität während die Polymaleoylderivate der Arginin-Inhibitoren voll aktiv blieben. Erst bei der Umsetzung der Guanidinogruppen letzterer mit einem Butandion-(2,3)-Reagens wurden sie inaktiviert.

Die Acylierung des modifizierten Trypsininhibitors aus Meerschweinchensamenblasen, bei dem die α-Aminogruppe im reaktiven Zentrum (Arg-X-Bindung gespalten) frei ist, bewirkte eine völlige Aufhebung der Hemmwirkung. Die Hemmaktivität der nativen Form (Arg-X-Bindung intakt) dieses Inhibitors bleibt nach Acylierung erhalten.

5.10 Die vollständige Strukturaufklärung des Trypsin- und des Trypsin-Plasmin-Inhibitors aus Meerschweinchensamenblasen ist im Gange. Sie wurde möglich, nachdem in mehrjähriger Sammeltätigkeit 8 kg Samenblasen gewonnen werden konnten.

Literaturverzeichnis

1 Anderer, F. A.: Z. Naturforsch. 20b, 462 (1965)

2 Anderer, F. A.: Z. Naturforsch. 20b, 499 (1965)

3 Anderer, F. A., S. Hörnle: J. Biol. Chem. 241, 1568 (1966)

4 Ambler, R. P., in "Methods in Enzymology", Vol XI, New York, 1967, Seite 155, Methode (i)

5 Austin, C. R.: Nature 170, 326 (1952)

6 Bedford, J. M., M. C. Chang: Amer. J. Physiol. 202, 178 (1962)

7 Bowman, P. E.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 57, 139 (1944)

8 Braunitzer, G.: persönl. Mitteilung

9 Burck, P. J., R. L. Hamill, E. W. Cerwinsky, E. L. Grinnan: Biochemistry 6, 3180 (1967)

10 Buttler, P. J. G., J. I. Harris, B. S. Hartley, R. Lebermann: Biochem. J. 103, 78 P (1967)

10a Dieselben ebenda 112, 679 (1969)

10b Chase, T., Jr., E. Shaw: Biochem. biophys. Res. Commun. 29, 508 (1967)

11 Chauvet, J., R. Acher: Bull. Soc. Chim. Biol. 49, 985 (1967)

11a dieselben,: J. Biol. Chem. 242, 4274 (1967)

12 Crestfield, A. M., S. Moore, W. H. Stein: J. Biol. Chem. 238, 622 (1963)

13 Dlouha, V., P. Pospisilova, B. Meloun, F. Sorm: Coll. Czech. Chem. Comm. 30, 1705 (1966)

14 Erlanger, B. F., N. Kokowsky: Arch. Biochem. Biophys. 95, 271 (1961)

15 Feeney, R. E., R. G. Allison: "Evolutionary Biochemistry of Proteins", New York, 1969

16 Feeney, R. E.: Biochemistry (Washington) 7, 2886 (1968)

17 Finkenstadt, W. R., M. Laskowski, Jr.: J. Biol. Chem. 240, PC 962 (1965)

18 dieselben, ebenda 242, 771 (1967)

19 Fraeyel, W., R. Acher: Biochim. Biophys. Acta 154, 615 (1968)

20 Fritz, H., E. Fink, M. Gebhardt, K. Hochstraßer, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 350, 933 (1969)

21 Fritz, H., E. Fink, R. Meister, G. Klein: Z. Physiol. Chem. (im Druck)

22a Fritz, H., B. Greif, W. Schramm, K. Hochstraßer, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 351, 139 (1970)

22 Fritz, H., M. Gebhardt, E. Fink, W. Schramm, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 350, 129 (1969)

23 Fritz, H., G. Hartwich, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 345, 150 (1966)

24 Fritz, H., I. Hüller, M. Wiedemann, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 348, 405 (1967)

24a Fritz, H., K. Hochstraßer, W. Schramm, E. Werle: in Vorbereitung

25 Fritz, H., K. Hochstraßer, E. Werle:Z. Analyt. Chem. 243, 452 (1968)

25a Fritz, H., P. Pasquay, E. Werle: in Vorbereitung

26 Fritz, H., H. Schult, M. Hutzel, M. Wiedemann, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 348, 308 (1967)

26a Fritz, H., H. Schult, R. Meister, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 350, 1531 (1969)

27 Fritz, H., I. Trautschold, H. Haendle, E. Werle: Ann. N. Y. Acad. Sci. 146, 400 (1968)

27a Fritz, H., K.-H. Oppitz, M. Gebhardt, I. Oppitz, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 350, 91 (1969)

28 Fritz, H., I. Trautschold, E. Werle in: Bergmeyer, H. U.: "Methoden der enzymatischen Analyse", Weinheim, 1970

29 Fritz, H., I. Trautschold, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 342, 253 (1965)

30 Fritz, H., F. Woitinas, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 345, 168 (1966)

31 Goodwin, T. W., R. A. Mortau: Biochem. J. 40, 628 (1946)

32 Gray, W. R., in: "Methods in Enzymology", Vol. XI, New York, 1967, S. 139

33 derselbe, ebenda S. 469

34 Green, N. M.: Biochem. J. 66, 407 (1957)

35 Green, N. M., E. Work: Biochem. J. 54, 347 (1953)

36 Greene, L. J., D. C. Bartelt: J. Biol. Chem. 244, 2646 (1969)

37 Greene, L. J., J. J. DiCarlo, A. J. Sussman, D. C. Bartelt: J. Biol. Chem. 243, 1804 (1967)

38 Greene, L. J., D. S. Fackre, M. Rigbi: Federat. Proc. 25, 3405 (1966)

39 Greene, L. J., J. S. Giordano, Jr.: J. Biol. Chem. 244, 285 (1969)

39a Greene, L. J.: Persönl. Mitteilung

40 Greene, L. J., M. Rigbi, D. S. Fackre: J. Biol. Chem. 241, 5610 (1966)

41 Grossberg, A. L., D. Pressman: Biochemistry (Washington) 7, 272 (1968)

42 Haendle, H., H. Fritz, I. Trautschold, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 343, 185 (1965)

43 Haendle, H., H. Ingrisch, E. Werle: Klin. Wschrft 48, 824 (1970)

44 Hais, I. M., K. Maceck: "Handbuch der Papierchromatographie", Jena, 1958

45 Ham, W. E., R. M. Sandstedt: J. Biol. Chem. 154, 505 (1944)

46 Haynes, R., R. E. Feeney: J. Biol. Chem. 242, 5378 (1967)

47 Haynes, R., R. E. Feeney: Biochemistry 7, 2879 (1968)

48 Haynes, R., R. E. Feeney: Biochemistry 7, 2547 (1968)

49 Haynes, R., R. E. Feeney: Biochim. Biophys. Acta 159, 209 (1968)

50 Haynes, R., D. T. Osuga, R. E. Feeney: Biochemistry 6, 541 (1967)

51 in: Heilmeyer, L.: "Lehrbuch der speziellen pathologischen Physiologie", Stuttgart, 1968, Seite 119

52 Hirs, C. W., in: "Methods in Enzymology", Vol XI, New York 1967, Seite 325

53 Hixson, H. F., Jr., M. Laskowski, Jr.: J. Biol. Chem. 245, in press (1970)

54 Hochstraßer, K., K. Illchmann, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 350, 929 (1969)

55 Hochstraßer, K., W. Schramm, H. Fritz, S. Schwarz, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 350, 893 (1969)

56 Hochstraßer, K., E. Werle: Z. Physiol. Chem. 350, 249 (1969)

57 Hochstraßer, K., E. Werle: unveröffentlicht

58 Hochstraßer, K., E. Werle, R. Siegelmann, S. Schwarz: Z. Physiol. Chem. 350, 897 (1969)

59 Kassell, B., M. Radicevic, S. Berlow, R. J. Peanasky, M. Laskowski, Sr.: J. Biol. Chem. 238, 3274 (1963)

60 Kassell, B., M. Radicevic, M. Laskowski, Sr.: Fed. Proc. 22, 529 (1963)

61 Kassell, B., M. Laskowski, Sr.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 17, 792 (1964)

62 Kassell, B., M. Radicevic, M. J. Ausfield, M. Laskowski, Sr.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 18, 255 (1965)

63 Kassell, B., M. Laskowski, Sr.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 20, 463 (1965)

64 Kazal, L. A., D. S. Spicer, R. A. Brahinsky: J. Am. Chem. Soc. 70, 3034 (1948)

65 Konigsberg, W., in: "Methods in Enzymology", Vol. XI, Seite 461, New York 1967

66 Kraut, H., E.K. Frey, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 192, 1 (1930)

67 Kunitz, M.: Science 101, 668 (1945)

68 Kunitz, M.: J. Gen. Physiol. 29, 149 (1946)

69 derselbe, ebenda 30, 291 (1947)

70 derselbe, ebenda 30, 311 (1947)

71 Kunitz, M., J. H. Northrop: J. Gen. Physiol. 19, 991 (1936)

72 Laskowski, M., Sr., F. C. Wu: J. Biol. Chem. 204, 797 (1953)

73 Laskowski, M., Jr., M. Laskowski, Sr.: J. Biol. Chem. 190, 564 (1951)

74 Laskowski, M., Jr., P. H. Mars, M. Laskowski, Sr.: J. Biol. Chem. 198, 745 (1952)

75 Laskowski, M., Jr., R. W. Sealock: "The Enzymes" 3. Auflage, im Druck

76 Liu, W.-H., G. Feinstein, D. T. Osuga, R. Haynes, R. E. Feeney: Biochemistry 7, 2886 (1968)

77 Luthy, J. A., M. Praissman, M. Laskowski, Jr.: Abstracts, 158th National Meeting of the American Chemical Society, New York, N.Y., September 1969, Biol. No 321

78 Neuhoff, V., F. van der Haar, E. Schlimme, M. Weise: Z. Physiol. Chem. 350, 121 (1969)

79 Neumann, F.: Naturw. Rdschau. 22, 371 (1969)

80 Niekamp, C. W., H. F. Hixson, Jr., M. Laskowski, Jr.: Biochemistry 8, 16 (1969)

81 Nissen, U., T. Astrup: Fed. Proc. 25, 193 (1966)

82 Ozawa, K., M. Laskowski, Jr.: J. Biol. Chem. 241, 3955 (1966)

83 Pütter, J.: Z. Physiol. Chem. 348, 1197 (1967)

84 Rigbi, M., L. J. Greene: J. Biol. Chem. 243, 5457 (1968)

85 Rudloff, V., G. Braunitzer: Z. Physiol. Chem. 323, 129 (1961)

86 Spackman, D. H., W. H. Stein, S. Moore: Anal. Chem. 30, 1190 (1958)

87 Stambaugh, R., J. Buckley: Science 161, 585 (1968)

88 dieselben, J. Reprod. Fert. 19, 423 (1969)

89 Stevens, F. C., R. E. Feeney: Biochemistry 2, 1346 (1963)

90 Suominen, J., S. Multamäki, M. Niemi: J. Reprod. Fert. 20, 135 (1969)

91 Trautschold, I., E. Werle, H. Haendle, H. Sebening: Z. Physiol. Chem. 329, 289 (1963)

92 Trautschold, I., Habilitationsschrift der Med. Fakultät, München, 1965
dieselben, ebenda 332, 328 (1963)

93 Tschesche, H., H. Klein: Z. Physiol. Chem. 349, 1645 (1968)

93a Tschesche, H., E. Wachter, S. Kupfer, K. Niedermeier: Z. Physiol. Chem. 350, 1247 (1969)

93b Tschesche, H.: Z. Physiol. Chem. 348, 1653 (1967)

94 Vogel, R., I. Trautschold, E. Werle: "Natürliche Proteinasen-Inhibitoren", Stuttgart, 1966

95 Walser, K., K. Ernst: Tierärztl. Wschr. 77, 393 (1964)

96 Weimann, D. E., W. L. Williams: Nature 203, 423 (1964)

97 Woods, K. R., K.-T. Wang: Biochim. Biophys. Acta 133, 369 (1967)

98 Zaneveld, L. J. D., P. N. Srivastava, W. L. Williams: J. Reprod. Fert. 20, 337 (1969)

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

BAPNA	N-α-Benzoyl-DL-Arginin-p-nitroanilid
BAEE	N-α-Benzoyl-DL-Arginin-äthylester
CM	Carboxymethyl
DF	Dekapazitationsfaktor
DNS	1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfo-
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
IU	Inhibitor-Units
MA	Maleinsäureanhydrid
mIU	Milli-Inhibitor-Units
MTI	Meerschweinchensamenblasen-Trypsininhibitor
MTPI	Meerschweinchensamenblasen-Trypsin-Plasmin-Inhibitor
NIH	National Institute of Health
O-MTI	MTI ohne Trypsinharz isoliert
O-MTPI	MTPI ohne Trypsinharz isoliert
SUPHEPA	Succinyl-L-Phenylalanin-p-nitroanilid
T-MTI	MTI mit Trypsinharz isoliert
T-MTPI	MTPI mit Trypsinharz isoliert
TPCK	L-(α-Tosylamido-ß-phenyl)-äthyl-chlor-methylketon

Lebenslauf

Geboren:	7.6.1941 in München
Vater:	Josef Fink, Fahrlehrer
Mutter:	Barbara, geb. Rothengaß
1947 - 1951:	Volksschule an der Wittelsbacherstraße, München
1951 - 1960:	Klenze-Oberrealschule, München Reifeprüfung: Juni 1960
seit November 1960:	Chemiestudium an der Universität München
Mai 1963:	Diplom-Vorprüfung
Februar 1966:	Diplom-Hauptprüfung
April 1966 - Januar 1967	Diplomarbeit unter Leitung von Prof. Dr.R. Hüttel, Abteilung für technische Chemie. Thema: "Gold(I)-chlorid-Komplexe von Decenen mit innenständiger Doppelbindung".
ab Februar 1967	Arbeiten zur vorliegenden Dissertation
ab Juli 1969	wissenschaftlicher Angestellter beim Sonderforschungsbereich 51, München.